

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANAS
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL H.U.P.M.
(CÁDIZ)
UNIDAD GESTIÓN CLÍNICA DE ENDOCRINOLOGÍA H.U.P.M. (CÁDIZ)
UNIDAD GESTIÓN CLÍNICA DE CIRUGÍA H.U.P.R (CÁDIZ)



TESIS DOCTORAL

Modelos de cirugía bariátrica en rata Wistar normopesa y no diabética. Cambios histológicos a nivel pancreático y en la homeostasis de la glucosa

ALONSO CAMACHO RAMÍREZ

CÁDIZ

FEBRERO 2015

Dr. D. José Arturo Prada Oliveira, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Anatomía y Embriología Humanas, y Dr. D. Gonzalo Martín Pérez Arana, Doctor en Medicina por la Universidad de Cádiz,

CERTIFICAN que el presente trabajo de investigación, titulado “Modelo de cirugía bariátrica en rata Wistar normopesa y no diabética. Cambios histológicos a nivel pancreático y en la homeostasis de la glucosa”, cumple con los criterios de objetividad y originalidad requeridos para ser presentado y defendido como Tesis doctoral; que dichos trabajos han sido realizados en instalaciones de la Universidad de Cádiz y en la Fundación para la Investigación Biomédica, ubicada en el Hospital Universitario de Puerta del Mar.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Cádiz a 4 de Febrero 2015.

Dr. José Arturo Prada Oliveira

Director

Dr. Gonzalo Martín Pérez Arana

Director

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Proyecto “Estudio de los mecanismos implicados en la remisión de la Diabetes tipo 2 mediada por diferentes tipos de cirugía bariátrica”. Investigador principal: Carmen Segundo Iglesias. Entidad financiadora Consejería de Salud. Junta de Andalucía. PI-0170-2010. Años 2010-2013.



UNIVERSIDAD
DE CÁDIZ

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
JUSTIFICACIÓN	5
INTRODUCCIÓN	9
A. PÁNCREAS: EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA	11
<i>A.1. DESARROLLO DEL PÁNCREAS. ANATOMÍA.</i>	<i>11</i>
A.1.1. Embriología.	11
A.1.2. Vascularización	13
A.1.3. Inervación.....	14
<i>A.2. ARQUITECTURA Y CÉLULAS DEL ISLOTE PANCREÁTICO. FUNCIÓN.....</i>	<i>15</i>
A.2.1. Arquitectura y distribución de los islotes	15
A.2.2. Células del islote pancreático. Función	15
a) Células beta: Insulina.....	15
b) Células alfa: Glucagón.	17
c) Células delta: Somatostatina.....	18
d) Células PP: Polipéptido pancreático.	19
e) Células Épsilon: Grelina.	19
<i>A.3. REGULACIÓN DE GLUCEMIA EN EL ORGANISMO.....</i>	<i>20</i>
<i>A.4. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DEL PÁNCREAS ENDOCRINO. MASA CELULAR BETA.....</i>	<i>22</i>
A.4.1. Apoptosis	23
A.4.2. Neogénesis / Proliferación	24
A.4.3. Hiperplasia/ Hipertrofia.....	25
A.4.4. Otros mecanismos	25
B. DIABETES. DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OTROS TIPOS DE DIABETES.....	27
<i>B.1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>27</i>
<i>B.2. MECANISMOS PATOGENÉTICOS.....</i>	<i>28</i>
B.2.1. Resistencia insulínica.....	29
B.2.2. Hiperglucemia y glucotoxicidad	30
B.2.3. Papel del Glucagón.....	30
B.2.4. Incretinas.....	31
B.2.5. Lipotoxicidad	31
B.2.6. Autoinmunidad e inflamación.....	31
B.2.7. Adipocinas	32
B.2.8. Péptido amiloide.....	32
B.2.9. Factores genéticos	32
<i>B.3. MASA CELULAR BETA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2.....</i>	<i>33</i>
C. OBESIDAD	35
<i>C.1. INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>35</i>
<i>C.2. OBESIDAD Y DIABETES.....</i>	<i>37</i>
D. CIRUGÍA BARIÁTRICA	39
<i>D.1. BREVES RESEÑAS ANATÓMICAS Y FUNCIONALES DEL TUBO DIGESTIVO.....</i>	<i>39</i>
D.1.1. Estómago	39
D.1.2. Yeyuno e íleon	40
<i>D.2. INTRODUCCIÓN</i>	<i>41</i>
<i>D.3. TÉCNICAS DE CIRUGÍA BARIÁTRICA</i>	<i>42</i>
D.3.1. Técnicas restrictivas	42
D.3.2. Técnicas malabsortivas	43
D.3.3. Técnicas mixtas.....	44
<i>D.4. CIRUGÍA BARIÁTRICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2.....</i>	<i>44</i>

HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	49
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
A. MATERIALES	59
Cirugía. Estadios pre, intra y postquirúrgicos	59
Fijación de material biológico.....	59
Estudio del número de células beta.....	60
Estudio de proliferación	60
Estudio de la neogénesis	61
Estudio de la apoptosis	61
Determinación de la masa beta.....	62
Determinación de insulina. Técnica ELISA	62
B. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	63
C. MÉTODOS.....	64
C.1. Grupos experimentales.....	64
C.2. Técnicas quirúrgicas	65
C.2.1. Control de ayuno (CA). Grupo control no quirúrgico	66
C.2.2. Sham (S). Grupo control quirúrgico.....	66
C.2.3. Resección intestinal masiva (RI50). Grupo quirúrgico malabsortivo.....	67
C.2.4. Bypass gástrico con montaje en Y de Roux (BG): Grupo quirúrgico mixto (restrictivo y malabsortivo)	69
C.2.5. Cirugía con gastrectomía vertical (GV): Grupo quirúrgico restrictivo	70
C.3. Determinaciones funcionales.....	72
C.3.1. Ingesta e incremento de peso.....	72
C.3.2. Determinación de la glucemia.....	72
C.3.3. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa	72
C.3.4. Determinación de la insulinemia basal	73
C.3.5. Índice de resistencia insulínica.....	73
C.4. Sacrificio y preparación de las muestras.....	74
C.5. Determinaciones tras el sacrificio.....	75
C.5.1. Estudio del número de células beta en el islote pancreático	75
C.5.2. Estudio de la proliferación en el islote pancreático	76
C.5.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas.....	77
C.5.4. Estudio de la apoptosis en las células beta	78
C.5.5. Estudio de la masa beta pancreática	80
C.6. Estudio estadístico.....	81
RESULTADOS.....	83
A. GRUPOS TRAS CIRUGÍA CON RESECCIÓN INTESTINAL DEL 50% VS. GRUPOS CONTROLES.....	86
A.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso	86
A.2. Resultados de las pruebas funcionales	87
A.2.1. Medición de glucemias.....	87
A.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa.....	87
A.2.3. Medición insulinemia basal	89
A.2.4. Test de resistencia insulínica	90
A.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreáticas.....	91
A.3.1. Estudio del número de células beta pancreática.....	91
A.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática.....	91
A.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas	92
A.4. Resultados del estudio de la histomorfometría y la masa de células beta	93
A.4.1. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas	93
A.4.1.1. Área media de los islotes	93

A.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total.....	93
A.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta	94
B. GRUPOS TRAS CIRUGÍA CON BY-PASS GÁSTRICO VS. GRUPOS CONTROLES	95
B.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso	95
B.2. Resultados de las pruebas funcionales.....	96
B.2.1. Medición de glucemias.....	96
B.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa.....	96
B.2.3. Medición insulínemia basal	97
B.2.4. Test de resistencia insulínica	98
B.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática .	99
B.3.1. Estudio del número de células beta pancreática.....	99
B.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática.....	99
B.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas	99
B.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática	100
B.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta	101
B.4.1. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas	101
B.4.1.1. Área media de los islotes	101
B.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total.....	101
B.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta.....	101
C. GRUPO TRAS CIRUGÍA CON GV VS. GRUPOS CONTROLES	103
C.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso	103
C.2. Resultados de las pruebas funcionales.....	104
C.2.1. Medición de glucemias.....	104
C.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa.....	104
C.2.3. Medición insulínemia basal	105
C.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática	107
C.3.1. Estudio del número de células beta pancreática.....	107
C.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática.....	107
C.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas	108
C.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática	108
C.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta	109
C.4.1. Histomorfometría	109
C.4.1.1. Área media de los islotes pancreáticos	109
C.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total.....	109
C.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta.....	110
D. RESULTADOS AGRUPADOS.....	111
D.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso.....	111
D.2. Resultados de las pruebas funcionales	113
D.2.1. Medición de glucemias	113
D.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa.....	113
D.2.3. Medición insulínemia basal	115
D.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática	116
D.3.1. Estudio del número de células beta pancreática	116
D.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática	116
D.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas	117
D.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática	117
D.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta	118
D.4.1. Histomorfometría	118
D.4.1.1. Área media de los islotes pancreáticos	118
D.4.1.2. Número de islotes/área pancreática total	118
D.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta	118
E. RESUMEN DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL PÁNCREAS.....	120
DISCUSIÓN	123

A.	CONSECUENCIAS SOBRE LA INGESTA Y EL INCREMENTO DE PESO	125
B.	DE LAS PRUEBAS FUNCIONALES REALIZADAS	130
B.1.	<i>Glucemia</i>	130
B.2.	<i>Frente al test de tolerancia intraperitoneal de glucosa (TTIPG)</i>	130
B.3.	<i>Insulinemia Basal</i>	138
B.4.	<i>Test de resistencia insulínica (HOMA-IR)</i>	141
C.	RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA POBLACIÓN CELULAR BETA PANCREÁTICA.....	142
C.1.	<i>Estudio del número de células beta en el islote pancreático</i>	142
C.2.	<i>Estudio de la proliferación en las células beta pancreática</i>	143
C.3.	<i>Estudio de los fenómenos de neogénesis en el páncreas</i>	145
C.4.	<i>Estudio de los fenómenos de apoptosis en la población de células beta pancreáticas</i>	146
D.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA HISTOMORFOMETRÍA Y LA MASA DE CÉLULAS BETA	148
D.1.	<i>Histomorfometría del páncreas</i>	148
D.2.	<i>Estudio de la masa de células beta pancreática</i>	149
E.	UNA VISIÓN DE CONJUNTO	151
F.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	152
	CONCLUSIONES	153
	BIBLIOGRAFÍA	157
	ANEXOS	171

ABREVIATURAS

Estas son las abreviaturas más utilizadas en este estudio. En la medida de lo posible se han utilizado las siglas en castellano, salvo para aquellos términos ampliamente asentados en sus versiones en inglés:

μ: Micras

μm: Micrómetro

μUI/mL: Microunidades internacionales/mililitro

ABC: Área bajo la curva

BG: By-pass gástrico en Y de Roux

BGAL: Banda gástrica ajustable por laparoscopia

CB: Cirugía bariátrica

cc: Centímetro cúbico

CD: Cruce duodenal

cm: Centímetro

DAB: 3-3'-diaminobencidina

DAPI: 4'-6'Diamino-2-fenil indol

DBP: Derivación biliopancreática

dl: Decilitro

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

g: Gramos

GIP: Gastric inhibitory polypeptide, péptido inhibidor gástrico

GLP-1: Glucagon-like peptide 1

GV: Gastroplastia Vertical

h: Hora

HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistance

IMC: Índice de masa corporal

kg: Kilogramo

mg/dl: Miligramos/decilitro

mg: Miligramo

min: Minutos

nm: Nanómetro

OMS: Organización mundial de la salud

P/V: Peso/Volumen

PBS: Phosfated buffered saline, tampón salino fosfato

PDX-1: Pancreatic duodenal homebox-1

PP: Polipéptido pancreático

STF: Suero de ternera fetal

TTIPG: Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

TTIVG: Test de tolerancia intravenosa de glucosa

TTOG: Test de tolerancia oral de glucosa

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl trasferase-mediated-dUTP Nick End Labelling

V/V: Volumen/Volumen

vs: Versus

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la obesidad son dos patologías que se solapan y padecen un alto porcentaje de los pacientes. La cirugía bariátrica (CB), en muchos casos, consigue la curación o la mejoría franca de ambas. Sus resultados, superan con creces a los obtenidos con las terapias médicas actuales.

Los efectos beneficiosos de la CB sobre la DM2 se manifiestan precozmente, antes incluso de una pérdida significativa de peso, por lo que la reducción o reversión de la obesidad explica solo parcialmente el efecto beneficioso sobre la DM2.

Una de las hipótesis más extendidas atribuye el efecto beneficioso sobre el metabolismo hidrocarbonado a los cambios en el tubo digestivo inducidos por las resecciones y/o modificaciones en el tránsito, así como el grado de digestión de los alimentos provocado por la CB. Estos cambios morfofuncionales provocarían la reversión de las alteraciones fisiopatológicas características de la DM2 que conducen a la hiperglucemia crónica (resistencia a la insulina y trastorno en su secreción).

Si la hipótesis de partida resultara correcta, existirían al menos dos mecanismos por los cuales se podrían aceptar la vinculación entre la precoz corrección de los niveles de glucemia tras la aplicación de las técnicas quirúrgicas; bien se producirían por influjos hormonales desde el tubo digestivo hacia el páncreas desde momentos muy tempranos tras la cirugía, o bien, la intensa alteración del tránsito de nutrientes y cómo estos se absorben, modificarían el funcionamiento de dicho páncreas.

En cualquiera de los posibles mecanismos, o de forma sinérgica entre todos ellos, aparece una nueva y evidente hipótesis que apunta a que existe una alteración/efecto sobre el páncreas. La CB induce cambios morfofuncionales en el islote pancreático modificando la población de células beta y su capacidad funcional. Este fenómeno ha sido descrito en páncreas de animales obesos y/o diabéticos. En páncreas humanos sólo hay referencias basadas de casos clínicos secundarias a las graves hipoglucemias mantenidas. Estas obligaron a pancreatectomías parciales pudiéndose objetivar los cambios histológicos referidos.

No obstante, la mayoría de estos resultados presentan sesgos, ya que, los estudios se han realizado en modelos con alteraciones patológicas concomitantes (fundamentalmente obesidad y/o DM2). Por tanto, no podemos obviar que quizás estas entidades clínicas pueden comportarse a su vez como sesgos de los propios mecanismos fisiológicos estudiados, es por esto que, se reduce aún más la bibliografía sobre estudios y los datos

obtenidos en animales sanos. Por supuesto no existen estudios pancreáticos en humanos sanos a los que se les haya realizado ninguna técnica bariátrica.

Las diversas técnicas de CB podrían inducir cambios fisiológicos, incluso con patrones propios según la técnica y con distintos grados de repercusión clínica. Esto podría ser debido a que cada técnica aborda distintas porciones del tubo digestivo, cada una de ellas con ciertas especificidades en cuanto a la producción de enterohormonas y a la gestión de los nutrientes. Todo lo anterior nos apunta a que podría existir una clara implicación de cada porción del tubo digestivo afectado según la cirugía y en la forma que este produce su acción sobre el páncreas a través de mediadores específicos hormonales.

La técnica de CB más usada actualmente es el Bypass Gástrico (BG), que posee un doble componente a nivel del tubo digestivo, restrictivo y malabsortivo. Seguida muy de cerca de la Gastrectomía Vertical (GV), técnica puramente restrictiva que en los últimos años, se está practicando incluso en mayor cuantía que la primera entre algunos servicios de cirugía. En la clínica diaria no se practica la técnica malabsortiva pura pero hemos decidido incorporarla por la experiencia quirúrgica y argumental de la línea de investigación además de abrir todas las opciones experimentales en los animales.

Para determinar los posibles cambios que puedan acontecer en el islote pancreático en ratas, hemos configurado los tres modelos quirúrgicos: la técnica mixta (BG), la restrictiva pura (GV), y la malabsortiva pura, mediante la resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50). Como modelo animal para aplicar estas técnicas quirúrgicas se ha utilizado la rata Wistar, una estirpe natural sin tendencia a la obesidad y sin alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. De esta forma, se eliminan situaciones como la obesidad y la resistencia insulínica que podrían enmascarar el efecto directo que ejerce la cirugía sobre el islote pancreático, que es lo que pretende dilucidar este trabajo. Conseguimos reproducir todos los modelos experimentales, incluyendo aquellos que mantienen y excluyen el paso de los alimentos a través de su recorrido fisiológico por el duodeno. Este fenómeno de la eventual exclusión duodenal argumenta algunas de las consideraciones de la dinámica funcional de este tipo de cirugía.

Las adaptaciones de las células beta en los islotes pancreáticos serán valoradas a través de distintas pruebas funcionales durante el seguimiento en el período de supervivencia de los animales de experimentación y el posterior estudio inmunohistoquímico del páncreas.

INTRODUCCIÓN

A. PÁNCREAS: EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

A.1. DESARROLLO DEL PÁNCREAS. ANATOMÍA.

A.1.1. Embriología.

El páncreas humano constituye uno de los órganos más pequeños y a la vez complejos del abdomen. Su características histológicas con doble función (endocrina y exocrina) pueden dar lugar, entre otras, a dos entidades de gran trascendencia mundial, la diabetes por mal función del componente endocrino y el adenocarcinoma de páncreas, por malignización de las glándulas de su tejido exocrino.

Es un órgano de origen endodérmico. El desarrollo es a partir de dos esbozos intestinales separados, dorsal y ventral. Su organogénesis comienza a partir de la cuarta-quinta semana de la gestación. Los tres tipos celulares más importantes del páncreas -las células ductales, acinares y endocrinas- tienen un origen embriológico común a pesar de tener estructura y funciones claramente diferenciadas. A nivel fisiológico podemos dividir al páncreas en dos tipos de tejidos, el páncreas exocrino, encargado de verter las enzimas necesarias para llevar a cabo el proceso de la digestión, y el páncreas endocrino, conformado por los islotes pancreáticos[1] (Figura 1).

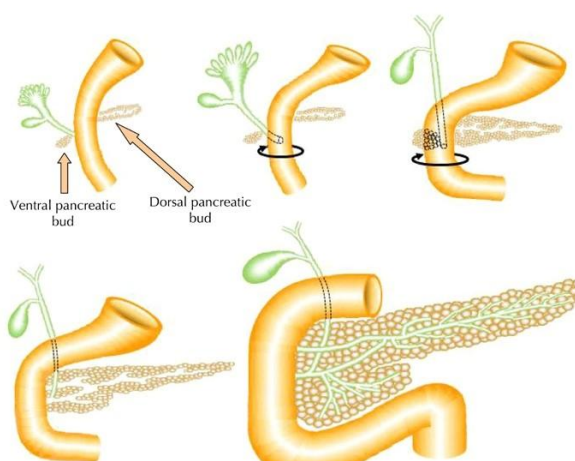


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo del páncreas [1].

Existen una serie de factores de transcripción implicados en la diferenciación pancreática a partir del epitelio del mesenterio, entre los que destaca PDX-1(IPF-1), que se expresa en ambos esbozos junto a otros factores de transcripción (Hnf1b, Hnf6, Prox1, etc). Para llevarse a cabo la diferenciación endocrina, es necesario la expresión transitoria del factor de transcripción Ngn3 (Neurogenina 3) [2] (Figura 2).

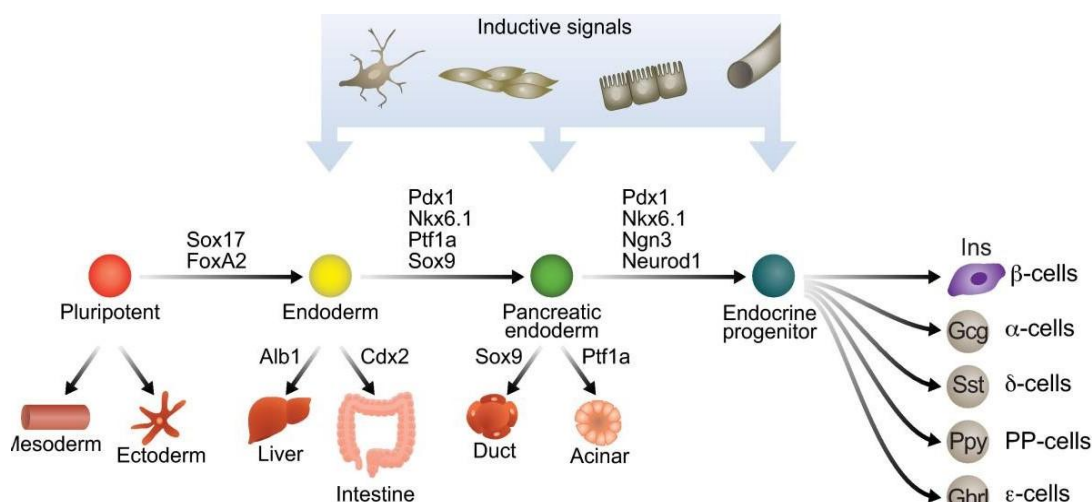


Figura 2. Distintos destinos posibles durante el desarrollo normal de una célula β [2].

El páncreas humano es una glándula que se divide en tres partes: cabeza, la parte más gruesa, que se encuentra medial en la curvatura del duodeno; cuerpo, posterior al estómago; y la cola junto al bazo. Es un órgano con función mixta. La función exocrina la lleva a cabo mediante la producción del jugo pancreático que drena en la segunda porción del duodeno a través de dos conductos excretores: uno principal, llamado conducto de Wirsung y otro accesorio llamado conducto de Santorini. Este jugo depende de los acinos pancreáticos y está formado por agua, bicarbonato, y numerosas enzimas digestivas [3]. Por otro lado, la función endocrina es la encargada de producir y segregar, entre otras, dos hormonas importantes, la insulina y el glucagón a partir de unas estructuras llamadas islotes pancreáticos. Descubiertos en 1869 por Paul Langerhans y veinte años después Von Mering y Minkowski revelaron su función endocrina. Ya en 1894, Laguesse atribuía esta función a los islotes y les daba el nombre de islotes de Langerhans haciendo honor a su descubridor [4]. La importancia de los islotes radica en ser el centro de control de la homeostasis de la glucosa en el organismo.

El páncreas de la rata es lobulado, aplanado y difuso. Se extiende dentro de una lámina de coalescencia limitando la cara posterior de la cavidad abdominal; enmarcado por la curvatura duodenal y ocupando la cara posterior del estómago. Su coloración es amarillo pardo con una textura laxa. Se encuentra embutido por tejido adiposo del cual a veces es difícil de distinguir. Su naturaleza difusa le confiere múltiples ductos largos, entre dos y ocho, que confluirán al conducto biliar común [5]. La subdivisión de las diferentes porciones del páncreas varía según el autor, diferenciándose el cuerpo, porción proximal al duodeno (también llamado cabeza pancreática, lóbulo derecho o segmento parabiliar y duodenal) y la porción distal, que reciben los sinónimos de cola, lóbulo izquierdo o parte terminal del segmento esplénico [6] (Figura 3).

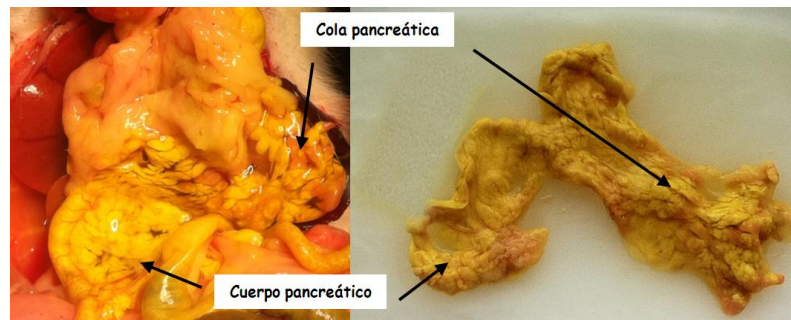


Figura 3. Páncreas macroscópico. In situ post-fijación (izquierda) y tras su extracción (derecha).

A.1.2. Vascularización

La vascularización del páncreas en humanos se lleva a cabo mediante ramas tributarias del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior. Los islotes pancreáticos se suministran a partir de arteriolas que se dividen en múltiples capilares fenestrados, estos se asemejan a un glomérulo renal. Los vasos sanguíneos durante la formación del páncreas, al igual que en otros órganos, no solo aportan nutrientes esenciales y el intercambio gaseoso, además proporcionan señales no nutricionales que juegan un papel clave en el control del crecimiento del órgano, la morfogénesis y la homeostasis. Esta red de vasos, en la mayoría de las especies, suministra sangre en primer lugar a las células beta de los islotes y posteriormente a las alfa, provocando la exposición de estas últimas a las secreciones de las células beta que suprimen tónicamente la secreción de glucagón. La sangre que sale de los islotes drena en la vena porta y de aquí al hígado [7] [8]. En las ratas, la vascularización y el drenaje venoso son muy similares sin notorias diferencias con el humano [9] (Figura 4 y 5).

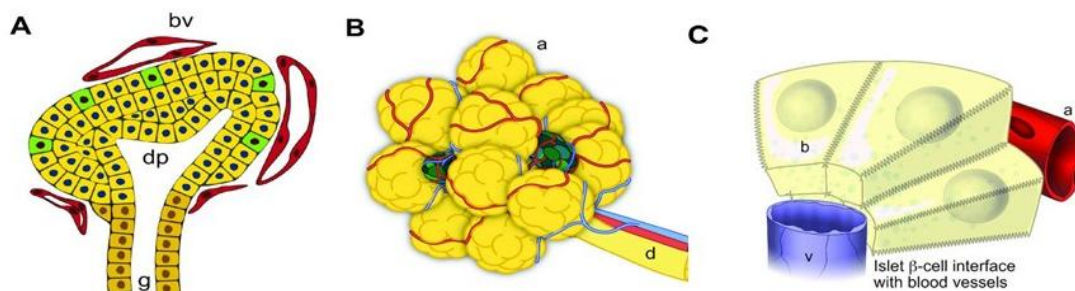


Figura 4. (A) El brote pancreático temprano se ubica inmerso en los capilares (rojo) que dominan el mesénquima intestinal. Las células endocrinas (verde) surgen en el epitelio de la yema (amarillo) (bv; vasos sanguíneos, dp, páncreas dorsal, g; tubo intestinal). (B) El árbol pancreático en desarrollo crece de forma coordinada con su vascularización (vasos rojo / azul) que se ejecutan a lo largo de los conductos. Los islotes (verde) están integrados dentro del abundante tejido exocrino (amarillo) (a, acinos, d, conducto pancreático). (C) Células beta de los islotes (amarillo) se organizan en torno a rosetas capilares en los islotes, en la que secretan hormonas endocrinas (a través de sus superficies laterales, que están cubiertas con microvellosidades). a; arteria, v; vena, b; célula beta [7]

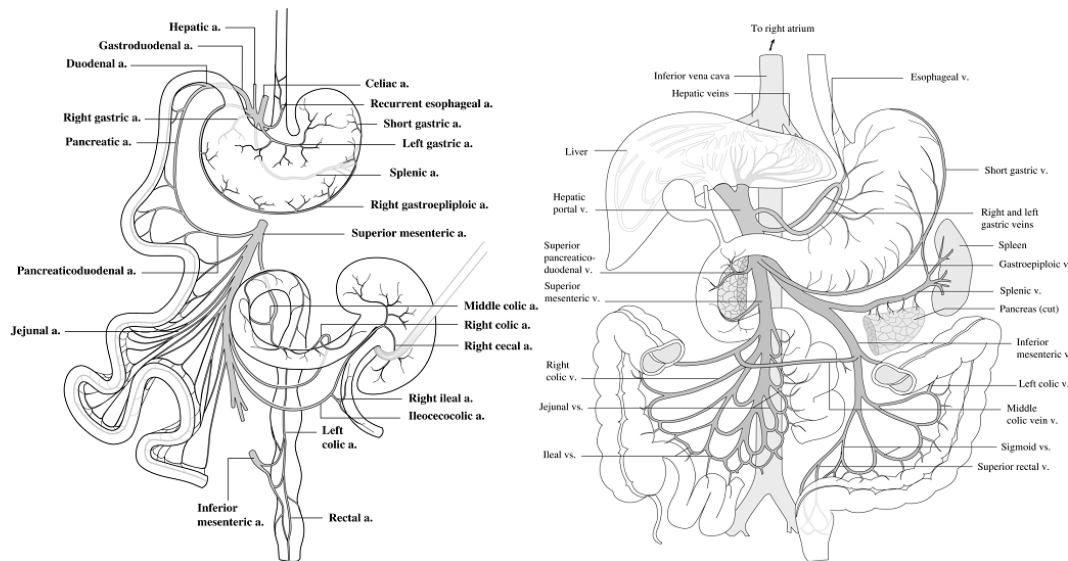


Figura 5. Vascularización arterial del tracto digestivo de la rata (izquierda) y venoso del humano (derecha). Ambos componentes circulatorios son similares en las dos especies [9].

A.1.3. Inervación

La inervación es vegetativa, doble -simpática y parasimpática-. Las fibras eferentes parasimpáticas se originan del núcleo motor dorsal del nervio vago (localizado en el tronco del encéfalo); estas fibras de la primera neurona realizan una sinapsis ganglionar cuyo axón realizará el efecto oportuno. Estos ganglios suelen encontrarse de forma intrapancreática o alojados en ganglios relacionados con el plexo celíaco, perivascular al tronco celíaco. Los neurotransmisores implicados en la vía parasimpática son la acetilcolina, liberada en ambas neuronas de la vía. Las hormonas peptídicas son moduladas por la secreción pancreática a través de cambios en la actividad parasimpática [10]. Los ramos simpáticos dependen de los nervios espláncnicos mayores y menores, que tienen su origen en la segunda neurona alojada en la cadena simpática paravertebral [5].

Los nervios simpáticos y parasimpáticos siguen las arteriolas en el islote, de manera similar a las fibras autónomas en otras localizaciones. No forman sinapsis clásicas, liberan sus neurotransmisores respectivos, noradrenalina y acetilcolina cerca de los islotes pancreáticos [11].

A.2. ARQUITECTURA Y CÉLULAS DEL ISLOTE PANCREÁTICO. FUNCIÓN.

A.2.1. Arquitectura y distribución de los islotes

El páncreas endocrino está organizado en los islotes de Langerhans, donde constituyen menos del 2% de la masa del páncreas. Existen cinco tipos de células endocrinas: α , β , δ , ϵ , y células polipéptido pancreático (PP) [12].

Los islotes pancreáticos en el humano aparecen como agrupaciones dispersas de células de carácter endocrino dentro del tejido pancreático exocrino, con un tamaño que varía entre los 40 y 400 μm de diámetro. Rodeando todo éste conjunto de células existe una cápsula constituida por tejido conectivo rico en colágeno y fibroblastos, que limita la periferia del islote con el tejido exocrino. La distribución es homogénea en las tres porciones del páncreas. Estas agrupaciones están constituidas por cinco tipos de células [13], [14].

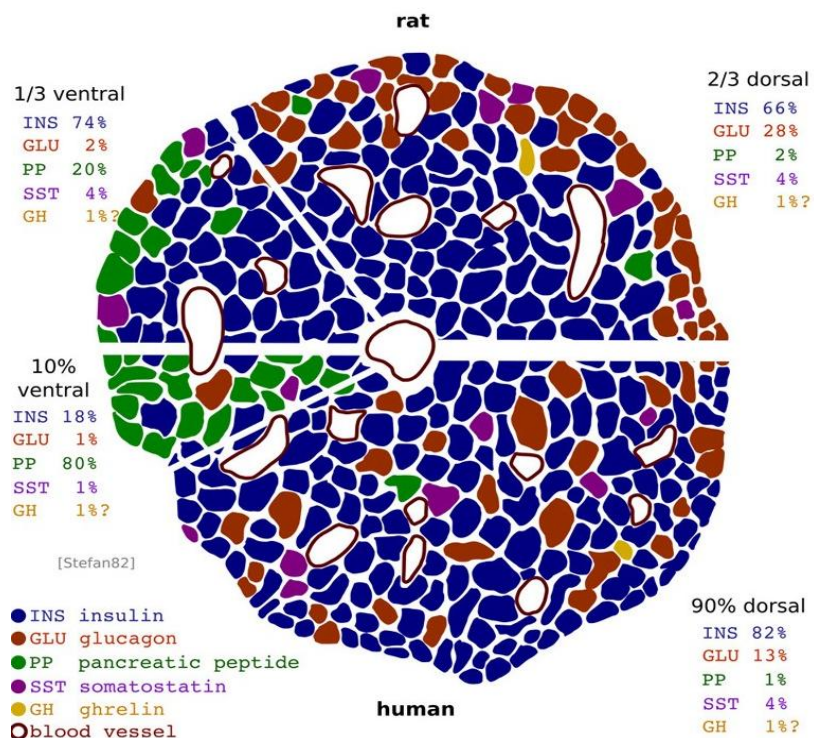
En las ratas la distribución del componente endocrino es irregular a lo largo de todo el componente exocrino. La mayor cantidad de islotes pancreáticos y de mayor tamaño se encuentran en la cabeza o lóbulo derecho [6]. Las células de los islotes pancreáticos se distribuyen de diferente manera en humanos y ratas. Las células beta en ratas, tienden a una distribución más central dentro del islote. Mientras que en humanos estas se distribuyen de manera uniforme tanto en la zona central como en la periferia del islote. También aparecen diferencias en el porcentaje de células beta dentro del islote entre humanos y ratas. En estas últimas el porcentaje ronda el 80-90% mientras que en humanos se encuentra en torno al 60-80% [15] (Figura 6).

A.2.2. Células del islote pancreático. Función

a) Células beta: Insulina.

Presentan un aspecto poliédrico con un tamaño que ronda los 300 nm. Poseen un citoplasma con una gran cantidad de gránulos de secreción que contienen insulina y Zinc, rodeados por trisqueliones, estructuras constituidas por una proteína llamada clatrina. También se observan gránulos inmaduros que contienen mayoritariamente proinsulina [16].

Figura 6. Composición celular en el islote pancreático. Obsérvese la diferencia de proporción de células del esbozo ventral y dorsal de cada especie [15].



En un páncreas humano adulto normal, la masa de células beta constituye menos del 2% del peso del páncreas [12]. Con aproximadamente un millón de islotes, repartidos por todo el páncreas, lo que se traduce en alrededor de mil millones de células beta y un peso global alrededor de 0,8 gr, que en algunos individuos obesos pueden alcanzar los 1,2 gr. [17].

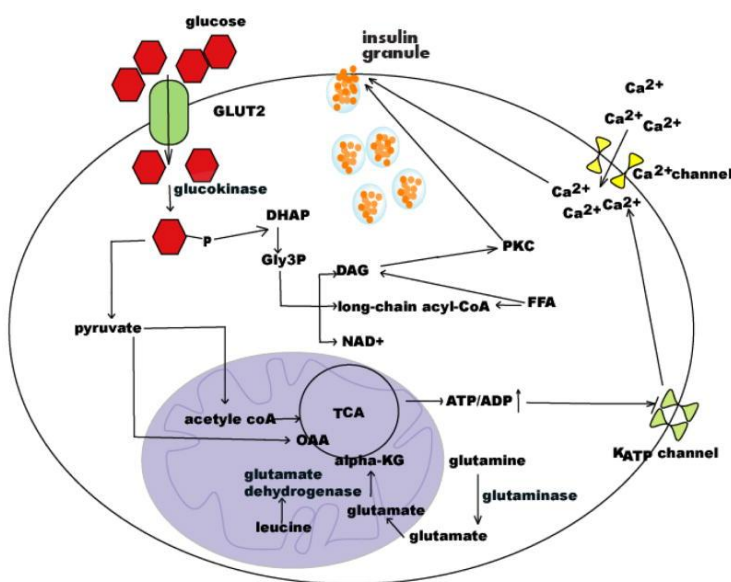
Esta medición de la masa beta, como cómputo inferido de cuánto pesarían todas las células beta de un páncreas, se ha convertido en una medida indirecta de los procesos de recambio celular. Como indicador veremos que se establecen una serie de mediciones que nos permiten determinar este parámetro. La masa de células beta en ratas depende, al igual que en el humano del ratio proliferación/apoptosis/neogénesis. Esta oscila a lo largo de la vida pero, a partir de los 100 días parece estabilizarse con una leve tendencia al aumento.

Insulina

La insulina es una hormona secretada por las células beta que presenta una cadena A de 21 aminoácidos y una cadena B de 30 aminoácidos unidas por dos puentes disulfuro. Se sintetiza a partir de la preproinsulina, que se escinde a proinsulina en el retículo endoplásmico de las células beta almacenándose posteriormente en vesículas con clatrina. Finalmente, la proinsulina se proteoliza dando lugar a la insulina activa y al péptido C, vertiéndose ambas al torrente sanguíneo.

En humanos, el gen de la pre-proinsulina se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11. El gen contiene tres exones: el primero codifica el péptido señal y el extremo N-terminal; el segundo es necesario para la cadena B y parte del péptido C; y el último para el resto del péptido C y la cadena A. En la rata existen dos genes que codifican la insulina a diferencia de lo comentado en el humano en el que sólo existe uno [18].

La glucosa es el estímulo más potente para la secreción de insulina. El acoplamiento estímulo-glucémico-secreción de insulina en la célula beta está ampliamente aceptado. La glucosa extracelular entra en el citosol a través de transportadores específicos (tipo GLUT-2), donde se metaboliza a piruvato mediante la



glicólisis. El piruvato en la **Figura 7. Secreción de insulina por la glucosa en la célula beta** [20]. La célula beta entra en la mitocondria, activando el ciclo de Krebs y dando lugar a la producción de CO_2 y los nucleótidos NADH y FADH₂. Estos últimos actúan como fuente de transferencia de electrones en la cadena de reacciones que participan en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP [19]. El incremento en la razón ATP/ADP da lugar al cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP (KATP), produciendo una despolarización de la membrana. Esta provoca el cierre de canales K-ATP activando los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, permitiendo así la entrada de Ca²⁺ desde el exterior. El incremento de Ca²⁺ en el citosol derivado de la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes del potencial de membrana es la señal que desencadena la secreción de insulina [20] (Figura 7).

b) Células alfa: Glucagón.

Presentan un menor tamaño que las células beta. Constituyen el 35-40% de las células del islote en humanos y el 15% en la rata [21]. La disposición en el islote es irregular en los humanos y periférica en la rata siendo más abundantes en la cola del páncreas de estas últimas. Las células alfa en su interior contienen principalmente gránulos

electrodensos de glucagón [22] [23]. En ambas especies, las células alfa se encuentran junto a las células beta secretoras de insulina, lo que sugiere una interacción local [8].

Glucagón

Descubierto en 1921, el glucagón es un polipéptido de cadena lineal que contiene 29 aminoácidos, sintetizada por las células alfa del islote pancreático. La hormona se secreta al torrente venoso llegando nivel hepático y actuando sobre los receptores acoplados a la proteína G en el hepatocito para estimular la producción de glucosa (glucogenolisis hepática). El glucagón *per se* o en asociación con otras hormonas contrarreguladoras como la adrenalina, es capaz de movilizar a los precursores (lactato, aminoácidos y glicerol) para llevar a cabo la gluconeogénesis hepática. De igual manera provoca la oxidación hepática de los ácidos grasos y la cetogénesis [24]. En el adipocito estimula la actividad lipasa dependiente de AMPc, que convierte triacilglicerol en ácidos grasos libres y glicerol [25].

La regulación de la secreción de glucagón de las células alfa es un sistema complejo provocado por los nutrientes, hormonas y neurotransmisores. Existen señales directas entre las propias células alfa y de manera indirecta por parte de las células beta, delta, sistema nervioso autónomo, incretinas intestinales así como de señales autocrinas [24].

c) Células delta: Somatostatina.

Constituyen un 5-8% de las células del islote y son las de menor tamaño, presentan prolongaciones citoplasmáticas y un gran número de gránulos que contienen somatostatina. Se disponen en la periferia del islote tanto en roedores como en humanos [22], [23].

Somatostatina

Denominada prosomatostatina, en su forma de prohormona, tiene 92 aminoácidos. Esta se somete a un proceso de post-traduccion diferencial y tejido específico que condiciona su expresión. El páncreas contiene; el producto activo (AA 1-4), un fragmento (1-28) y la prosomatostatina (AA 1-64).

La somatostatina inhibe la secreción de muchas hormonas, entre ellas la insulina y el glucagón fundamentalmente a nivel paracrino, actúa no solo a nivel pancreático, también lo hace en el tracto digestivo y sistema nervioso [27] (Figura 8). Su secreción se encuentra regulada por numerosos factores entre los que se incluye la glucosa, los aminoácidos y los cuerpos cetónicos, que la estimulan con una relación dosis-respuesta. Algunas enterohormonas como la gastrina, colecistoquinina (CCK), péptido inhibidor gástrico (GIP)

y secretina, además de los agentes colinérgicos y beta adrenérgicos, ejercen, también una regulación positiva de control. Por otra parte, el glucagón posiblemente por un mecanismo paracrino estimula su secreción. Los agentes alfa 2 adrenérgicos por el contrario la inhiben [26], [27].

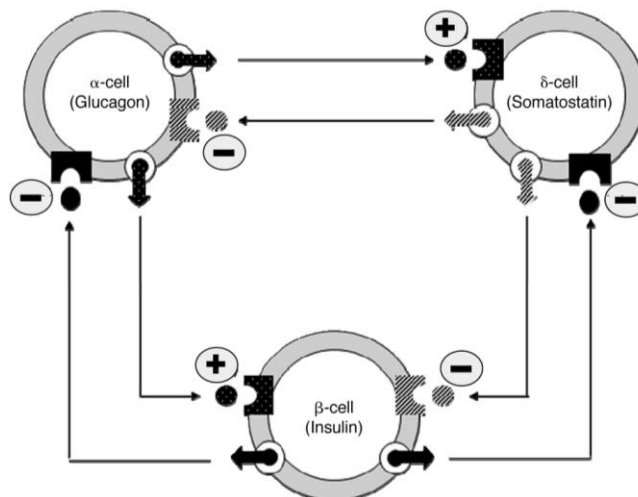


Figura 8. Regulación paracrina entre las células α , β y δ y la liberación de sus hormonas [27].

d) Células PP: Polipéptido pancreático.

Las células PP, representan menos del 1 % de las células del páncreas. Presentan gránulos que contienen polipéptido pancreático, estos son más abundantes en la cabeza [23].

Polipéptido Pancreático

El papel preciso del PP en el páncreas es en gran parte desconocido. En los seres humanos, se han descrito efectos inhibidores en la contracción de la vesícula biliar y la liberación de enzimas de páncreas. Los estudios en animales sugieren que el PP puede influir en la ingesta de alimentos, el metabolismo energético, y la expresión de grelina y péptidos hipotalámicos [28].

e) Células Épsilon: Grelina.

Por último la célula épsilon, descubierta en estos últimos años [13], se encuentran en la periferia de los islotes pancreáticos. Son las encargadas de la producción de grelina a nivel pancreático. Se distribuyen de manera homogénea entre la cabeza, cuerpo y cola representando menos del 1 % [29]. Tiene una mayor actividad en el páncreas durante el

periodo perinatal reduciéndose esta con los años. Se encuentran tanto en ratas como en humanos [14, 22, 30].

Grelina

El péptido recibió el nombre de grelina por su capacidad para estimular la hormona del crecimiento (GH) (GH-Relin). En ratas sólo el 20% de la grelina circulante permanece después de la resección del fundus gástrico, sin embargo en los seres humanos, permanece en sangre el 35-45% después de una gastrectomía total [29]. Existen otras fuentes de secreción como son el páncreas, intestino, riñón,

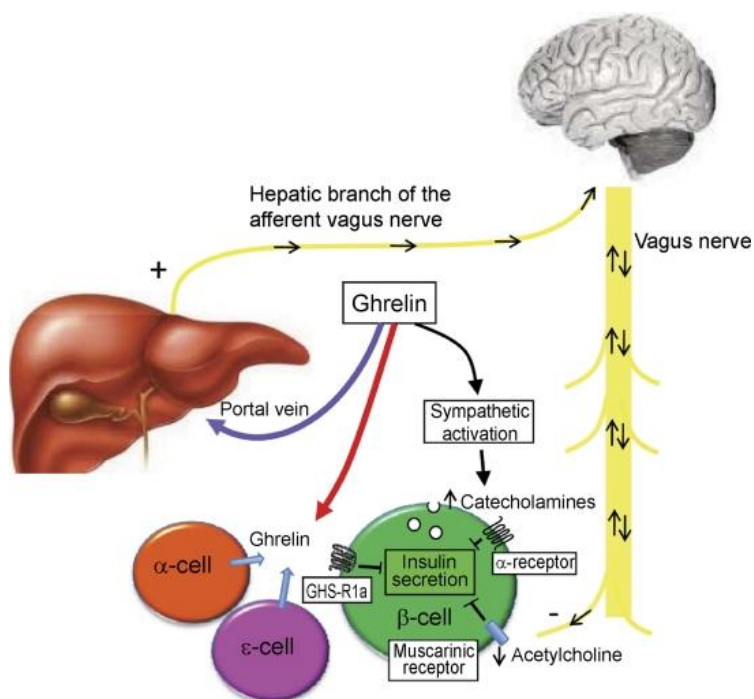


Figura 9. Mecanismos por el que la grelina puede inhibir la secreción de insulina [32].

sistema inmunológico, la placenta, testículo y el pulmón [31]. No obstante parece existir una mayor densidad de células productoras de grelina a nivel pancreático que gástrico durante la etapa embrionaria, gradiente que se invierte tras el nacimiento.

La grelina parece inhibir la liberación de insulina tanto en humanos, ratas y ratones. Se sugiere que la liberación de la grelina de dichas células tendría un efecto inhibitorio paracrina de la secreción de insulina [32] (Figura 9), aunque existen también publicaciones que mencionan efectos estimulantes. Parece que a bajas concentraciones de grelina se suprime la secreción de insulina, mientras que concentraciones elevadas la aumentan [29], [33].

A.3. REGULACIÓN DE GLUCEMIA EN EL ORGANISMO

La glucosa $C_6H_{12}O_6$ pertenece al grupo de los hidratos de carbono. Tanto humanos como ratas la utilizan como fuente de energía. En tejidos como la retina, epitelio germinal y el cerebro es necesaria para la realización de gran parte de sus funciones. En el cerebro, las

reservas de glucógeno son muy escasas, por lo que su estabilidad va a depender casi en exclusiva de la glucemia circulante.

Las concentraciones extracelulares de la glucosa oscilan en condiciones normales entre 70 (ayunas) y 140 mg/dl (postprandial). La llegada de la glucosa a la célula se realiza a través de la apertura de los transportadores de glucosa GLUT-2 mayoritariamente en roedores y humanos. Aunque los transportadores GLUT-1 y -3 parecen tener un papel importante también en humanos [34].

La insulina y el glucagón actúan de manera opuesta para mantener la homeostasis de glucosa en sangre. Tras la ingesta de alimentos, se produce la secreción de insulina, estimulando el almacenamiento de la glucosa a nivel intracelular y la consecuente reducción de sus niveles sanguíneos. Durante el ayuno, para evitar la hipoglucemia, el glucagón moviliza la glucosa desde los tejidos periféricos elevando la glucosa en sangre [12].

El estímulo más potente para la secreción de insulina es la glucosa. Algunos aminoácidos y ácidos grasos libres son igualmente capaces de producir este efecto [20]. La activación de los mecanismos y con ello la secreción de insulina se lleva a cabo en cuestión de minutos. Sin embargo, en caso de hipoglucemia, la inhibición se lleva a cabo de manera casi inmediata [35].

Los principales efectos de la insulina los podemos dividir en los ejercidos a nivel paracrino, como la inhibición de la secreción de glucagón en las células alfa, y aquellos con carácter endocrino, entre los que encontramos que a nivel hepático provoca el estímulo para la glucogenogénesis, síntesis proteica y lipídica. En el músculo estriado induce la glucogenogénesis y la síntesis proteica. De igual manera en el tejido adiposo provoca un aumento de la síntesis y almacenamiento de triglicéridos [36] (Figura 10).

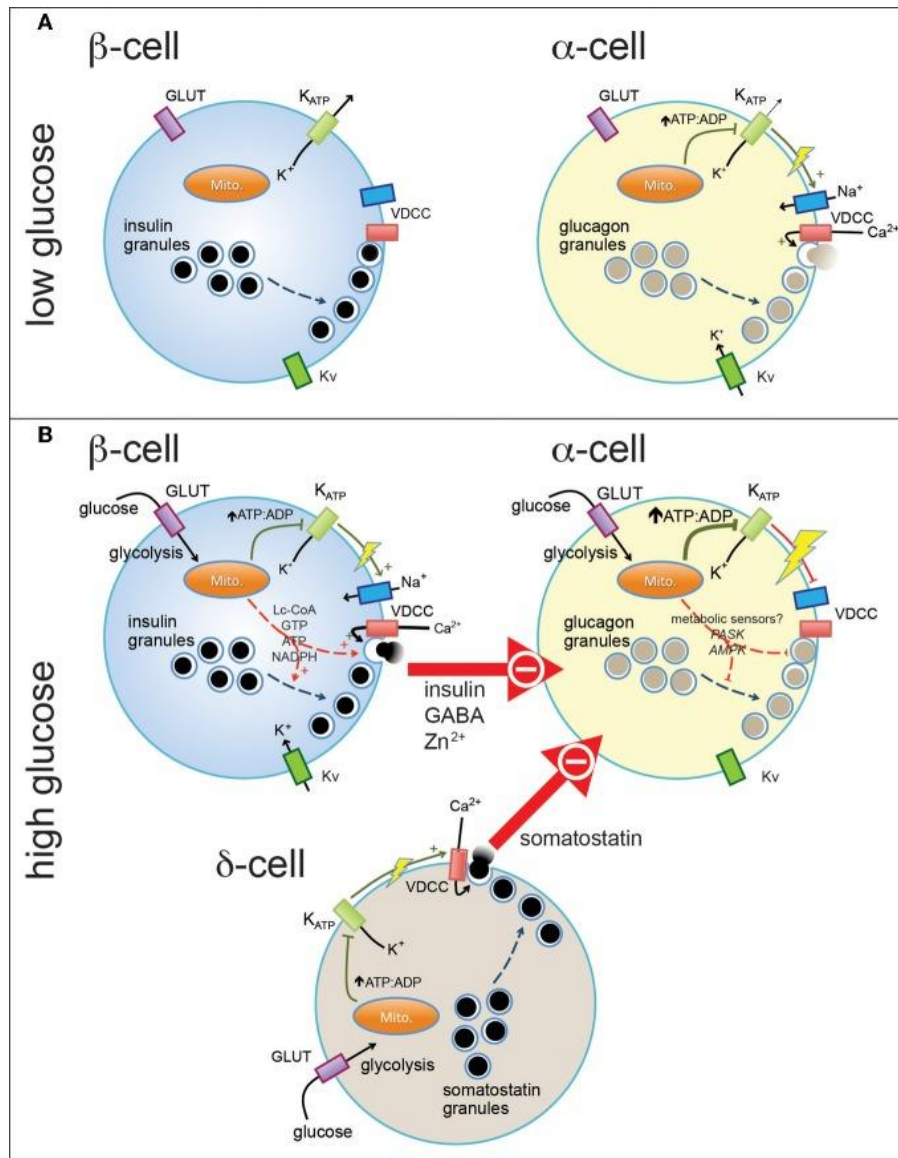


Figura 10. Comportamiento de las células endocrinas ante situaciones con cifras bajas de glucemia (A). Inactivación casi automática de la célula beta con ausencia de secreción de insulina. (B) Ante hiperglucemias, no sólo se provoca activación de la célula beta, sino que existe inhibición paracrina de la célula alfa por señales de la célula beta y delta [36].

A.4. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DEL PÁNCREAS ENDOCRINO. MASA CELULAR BETA.

La masa beta en el individuo varía según diferentes situaciones, estas circunstancias inducirán modificaciones en el páncreas endocrino como respuesta a los cambios ocurridos en el medio interno, tanto fisiológicos (desarrollo embriológico, embarazo) como patológicos (obesidad, pancreatitis necrotizante, etc). Estas variaciones tienen como finalidad el mantenimiento de la normoglucemia y la homeostasis del tejido endocrino pancreático. Para ello existen varios mecanismos que conllevan variaciones de la masa celular beta o de la sensibilidad a la glucosa de la propia célula beta [37, 38].

La homeostasis de la masa de células beta es un proceso complejo. Depende tanto del volumen (hipertrofia) como del número de células (hiperplasia). Se consigue gracias a los procesos de proliferación (replicación de las células de islotes existentes), neogénesis (diferenciación de las células de los islotes a partir de células precursoras y epiteliales ductales) y de apoptosis (muerte celular programada). El páncreas, con estos mecanismos, intentará asegurar una adecuada función celular y con ello un exquisito control glucémico [39].

Los cambios en la masa beta a medio-largo plazo se consiguen gracias a la actuación de los múltiples mecanismos descritos anteriormente (proliferación/neogénesis/apoptosis). Estos pueden actuar al unísono tanto en los cambios expansivos como en los involutivos. El control glucémico a corto plazo lo consigue gracias a adaptaciones funcionales (aumento en síntesis y/o secreción de insulina, umbral de respuesta a estímulos, etc) [40]

A.4.1. Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Dentro de las características morfológicas de la apoptosis se incluyen el “blebbing” de la membrana plasmática, la condensación del citoplasma y la activación de una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} que rompe la doble cadena del DNA en los lugares internucleosómicos generando mono y oligonucleosomas [41]. Existen dos vías de activación posibles de este mecanismo, denominadas vía extrínseca e intrínseca, ambas mediadas por proteínas mediadoras y efectoras de la familia de las caspasas con elementos de regulación diferentes.

La apoptosis juega un importante papel en la homeostasis del páncreas endocrino, desde las etapas embrionarias.

Salvo durante la remodelación neonatal del páncreas endocrino que se produce antes del destete en roedores y en torno al nacimiento en humanos, la frecuencia de apoptosis en las células beta pancreática es limitada. No obstante en modelos de roedores, se han observado oleadas de apoptosis de células beta durante procesos fisiológicos de remodelación del páncreas endocrino como el que acontece durante el periodo neonatal [42].

A.4.2. Neogénesis / Proliferación

La neogénesis y la proliferación constituyen los otros dos mecanismos responsables de la plasticidad de la masa celular beta. Ambos, en contraposición a la apoptosis, aumentan y expanden la masa de células beta en respuesta a distintos estímulos.

Si el proceso se produce en base a células beta preexistentes se denomina proliferación, si ocurre en base a células precursoras (pudiendo éstas tener su origen en células pancreáticas y no pancreáticas) hablaremos de neogénesis [43], [44] (Figura 11).

Los mecanismos que regulan la replicación y proliferación de las células beta son principalmente dos vías de señalización que regulan la expresión de genes de supervivencia y control del ciclo celular: La vía de las MAP quinasas (Mitogen- activated- protein- kinases) y la vía AKT/PI3 K (Phospho-Inositide 3-Kinase) [45] [46, 47].

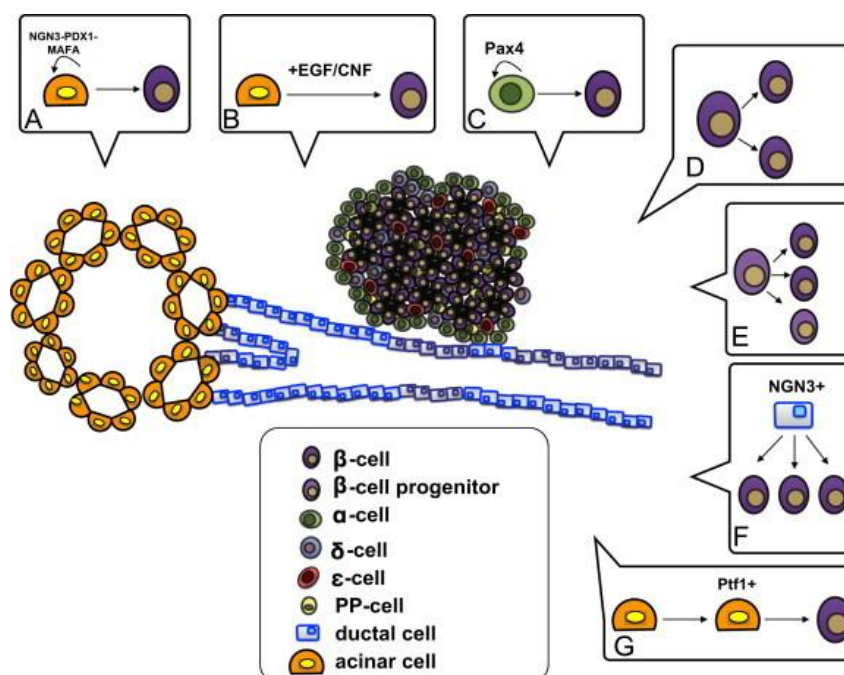


Figura 11. Formas potenciales de regeneración de las células beta [48]

A.4.3. Hiperplasia/ Hipertrofia

Podemos definir hiperplasia como aquel fenómeno mediante el cual aumenta el número de células beta en contraposición con el fenómeno denominado hipertrofia en el cual aparece un incremento del tamaño del citoplasma de un tipo celular. Este concepto se relaciona, al menos inicialmente, con un aumento de la función celular. Un grupo celular aumenta su tamaño normalmente a expensas de su citoplasma, a partir de la acumulación o síntesis de los productos implicados en su fisiología.

A.4.4. Otros mecanismos

Las variaciones en la sensibilidad a la glucosa de la masa celular beta es otro de los mecanismos implicados en el mantenimiento de una adecuada respuesta a los requerimientos de insulina por parte del organismo en diferentes situaciones. Este sistema permite regular la secreción de insulina inducida por la glucosa a través de la activación total o parcial de la enzima glucoquinasa [49] y gracias a la presencia de poblaciones de células beta con un amplio espectro de sensibilidad a las variaciones de la glucosa [50].

Las enterohormonas, entre las que destacan el GLP-1 (Glucagon-Like Protein 1) y el GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide/Péptido Inhibidor Gástrico) intervienen en gran medida en la regulación de la función de la célula y la masa beta [51,52] (Figura 12 y Tabla 1).

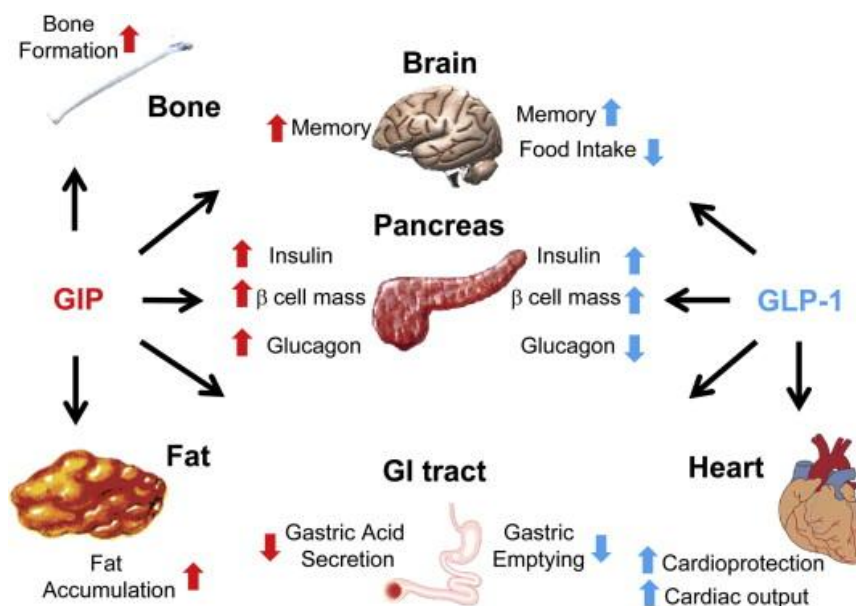


Figura 12. Efectos sistémicos de las incretinas [51]

	GLP-1	GIP
Insulin secretion	↑ via K_{ATP} channels closure or cAMP/Epac2 activation	↑ via cAMP/PKA-dependent K_V channels closure
Insulin synthesis	↑ by increasing Pdx-1 expression or the binding of Pdx-1 to insulin promoter via cAMP/PKA- or cAMP/Epac/TORC2-dependent mechanism	↑ via PI3K/AKT-dependent FoxO1 nuclear exclusion and Pdx-1 nuclear translocation
Proliferative and anti-apoptotic action	↑ by inhibiting FoxO1 activity and subsequently upregulating Pdx-1 expression via PI3K/AKT or cAMP/PKA/CREB-dependent mechanism	↑ by decreasing the apoptotic Bax promoter activity or stimulating the nuclear translocation of Pdx-1 via cAMP/PKA/CREB- or PI3K/AKT-dependent mechanism
ER stress reduction	↓ via the enhancement of ATF4 translocation and GADD34- mediated dephosphorylation of eIF2 α	Not yet determined
β -cell neogenesis	↑ via the increase in Pdx-1 expression	Not yet determined

GLP-1, glucagon-like peptide-1; GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; ER, endoplasmic reticulum.

Tabla 1. Las acciones biológicas de GLP-1 y GIP en las células β [52]

El sistema nervioso y su ramas viscerales (nervio vago) de igual manera juegan un papel importante en el mantenimiento de este recambio y renovación celular mediante procesos de proliferación y neogénesis [53, 54].

B. DIABETES. DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OTROS TIPOS DE DIABETES.

B.1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una entidad clínica metabólica que resulta de un fallo en la regulación de glucosa, causando hiperglucemia, daño de tejidos y órganos, con el aumento de la morbilidad y la mortalidad.

Bajo la acepción de DM podemos encontrar una serie de patologías con un eje común: niveles altos de glucosa en sangre. Entre estas encontramos la diabetes tipo 1(DM1), tipo 2(DM2), diabetes gestacional, diabetes MODY o la diabetes LADA. No obstante y en función a su prevalencia en la población podríamos destacar la DM1 y DM2.

La DM1 es secundaria a la destrucción autoinmune de células beta productoras de insulina en el páncreas.

La DM2 se asocia en alta frecuencia con la obesidad. Es un proceso cuya base es una pérdida de sensibilidad a la insulina por parte de sus tejidos diana: hígado, músculo esquelético y grasa. Esta situación lleva a la persistencia de niveles altos de glucosa en la sangre que sobrepasan la capacidad de las células beta para producir suficiente insulina y limitar con ello la hiperglucemia. Esta alta demanda ejercida sobre las células beta de manera prolongada conduce con el tiempo a su mal funcionamiento y a la muerte. El número de células beta perdidas en la DM2 es importante pudiendo acercarse al 60%. Las células beta restantes presentan en este caso un alto grado de agotamiento y serios problemas para desempeñar su función de manera adecuada. La presentación clínica de los pacientes es muy variable, desde asintomática a cuadros cetoacidóticos por lo que las concentraciones de glucosa en sangre en el momento del diagnóstico pueden oscilar desde cifras ligeramente elevadas a hiperglucemias graves.

La regulación deficiente y persistente de la homeostasis de la glucosa también conduce a una variedad de complicaciones secundarias muy importantes, incluyendo la enfermedad cardiovascular, retinopatía (llegando incluso a la ceguera), neuropatía a diferentes niveles pudiendo provocar amputaciones, trastornos gastrointestinales, sexuales y la nefropatía cuyo estadio final es la insuficiencia renal crónica con necesidad de diálisis. De acuerdo con el C.D.C. (*Center for Disease Control*), la diabetes es la causa principal de insuficiencia renal, ceguera y amputaciones en adultos estadounidenses. Las complicaciones cardiovasculares, que son aún más comunes, conducen en gran medida a un aumento de los

costos de salud y la reducción de la esperanza de vida. Mejorar el control de la glucemia podría así evitar estas complicaciones y con ello proporcionar una mejor calidad de vida de estos pacientes [2].

Las manifestaciones metabólicas de la DM2 van a incluir:

- Hiperglucemia, resultante de la resistencia periférica a la insulina y de su secreción inadecuada.
- Ausencia de supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la ingesta de glucosa.

B.2. MECANISMOS PATOGENICOS

Los órganos diana fundamentalmente implicados son; hígado, músculo y tejido adiposo. Las actuales teorías que explican la patogenia de la DM2 son [55] (Figura 13):

- Defecto en la captación de glucosa mediada por la insulina en el músculo esquelético.
- Alteración de la función secretora de los adipocitos.
- Disfunción de las células beta del páncreas (glucotoxicidad, lipotoxicidad y la agregación de amiloide en los islotes)
- Problemas de detección y respuesta a la hiperglucemia en el SNC.
- Acumulación excesiva de lípidos y oxidación de ácidos grasos. Deterioro debido a la obesidad, la inactividad física y la predisposición genética [55, 56].
- Defecto de estimulación de las hormonas incretinas [57], [58].

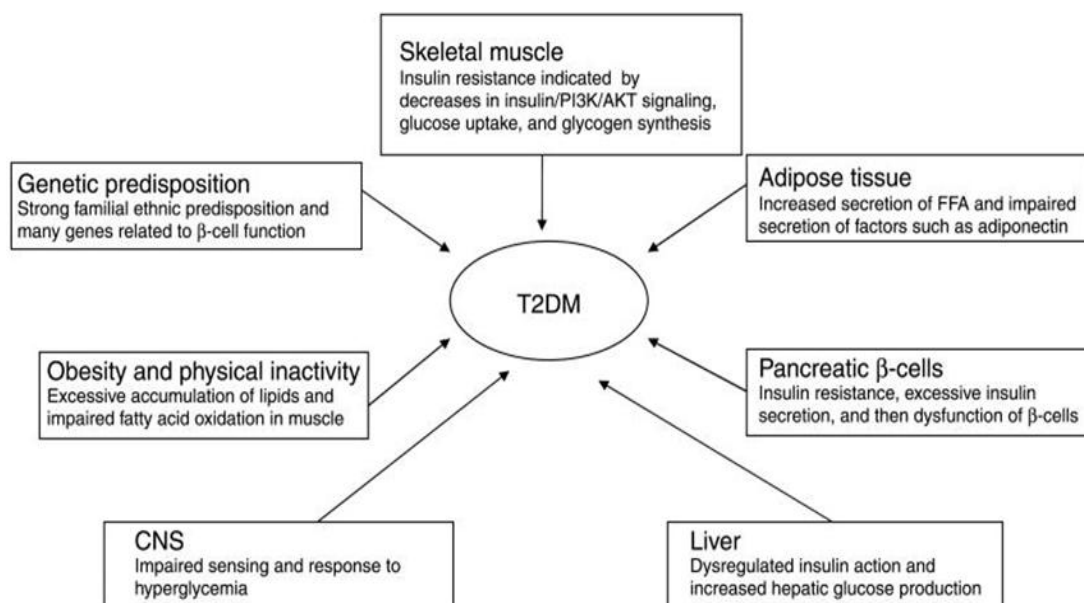


Figura 13. Mecanismos patogénicos [59]

B.2.1. Resistencia insulínica

La resistencia a la insulina es un fenómeno característico de los tejidos periféricos; músculo esquelético, tejido adiposo y principalmente el hígado. Se ha definido como una disminución de la sensibilidad a la insulina en los mismos, lo que provoca un aumento de la demanda de dicha hormona a las células beta, a fin de compensar el defecto en la acción de la insulina. Esta alta exigencia metabólica conduce a una disfunción progresiva de las células beta y a su fracaso final. Existen diversas hipótesis que podrían explicar lo acontecido. Una es que la hipersecreción de insulina finalmente hace que las células beta cedan por agotamiento, mientras que otras sugieren que los factores que conducen a la resistencia a la insulina (lipotoxicidad, glucotoxicidad, amiloide...etc) también provocan la disfunción de las células beta [60].

Existen diversos métodos para medir la sensibilidad a la insulina. El clamp euglicémico es el método *gold standard* por su sensibilidad y reproducibilidad [61]. Debido a su complejidad se utilizan otros métodos como el HOMA (Homeostasis Model Assessment) o el QUICKI (Quantitative insulin sensitivity check index), que requieren de los niveles basales de glucosa e insulina aunque no son capaces de valorar cambios dinámicos en la secreción de insulina [62]. El HOMA ha sido sugerido como método para determinar la insulino-resistencia. Un índice mayor de 2-2,5 indicaría insulino-resistencia. El clamp de glucosa mide insulino-resistencia directamente mientras que el índice HOMA es un método indirecto que ha sido validado [63]. La sobrecarga oral, intravenosa o intraperitoneal de glucosa son pruebas dinámicas que nos informan del estado de diabetes o de intolerancia a

la glucosa tanto en humanos como en animales de experimentación, siendo igualmente válidas y complementarias a los métodos ya comentados [62].

B.2.2. Hiperglucemia y glucotoxicidad

Las células beta pancreáticas son extremadamente sensibles a las concentraciones de glucosa en sangre, cambios en su función influyen en su homeostasis y en la dinámica de su población. La exposición crónica de altos niveles de glucosa en sangre tienen efectos perjudiciales en la síntesis/secreción de insulina, supervivencia celular y la sensibilidad a la insulina a través de múltiples mecanismos, es lo que se conoce con el nombre de "glucotoxicidad", que a su vez conducen a la hiperglucemia sostenida y finalmente al círculo vicioso de deterioro continuo de la función de las células beta [64].

Existen múltiples vías y mecanismos mediante los cuales la hiperglucemia crónica puede alterar la función de las células beta llegando a provocar la apoptosis de las mismas. Se han sugerido como causas:

- La pérdida gradual de la expresión del gen de insulina.
- La exposición a un estrés oxidativo crónico y con ello un incremento de pro-oxidantes y un aumento del daño tisular.
- El estrés del retículo endoplásmico por aumento de la demanda de proinsulina, disminución del número y morfología de las mitocondrias en las células beta [65].

B.2.3. Papel del Glucagón

El glucagón en la DM2 presenta una secreción inadecuada y excesiva, debido a la ausencia del freno postprandial establecido por los niveles de insulina, dando como consecuencia un aumento de las cifras de glucemia. A nivel hepático existe un aumento de la neoglucogénesis [24] (Figura 14).

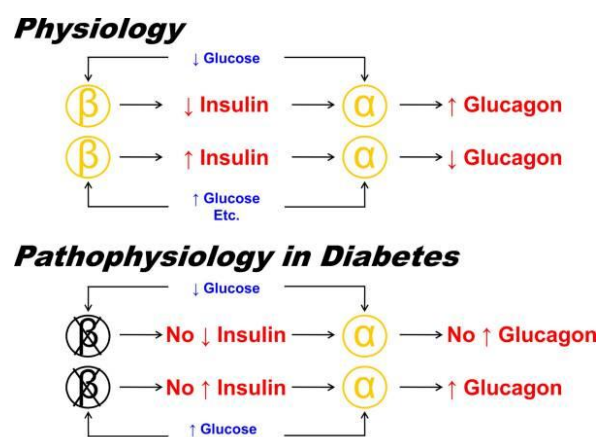


Figura 14. Fisiología y fisiopatología de la DM2 evolucionada [24]

B.2.4. Incretinas

En la DM2 el deterioro de la acción de las incretinas no es tanto un déficit de la liberación sino la resistencia a su acción, lo que contribuye a la disfunción de las células beta pancreáticas y el consecuente déficit de insulina [66]. La hiperglucemia amplifica aún más la alteración del efecto incretina, en parte por regulación, disminución o la desensibilización de sus receptores específicos [67]. Así pues alrededor del 50% de los familiares de primer grado de pacientes con DM2 presentan reducida la respuesta insulínica tras la administración exógena de GIP. No se observan sin embargo, cambios significativos en la secreción de GIP y GLP-1 después de la ingesta oral de glucosa [68], [69].

B.2.5. Lipotoxicidad

La diabetes se asocia a menudo con los cambios en los perfiles de lipoproteínas y el aumento de las concentraciones de ácidos grasos libres. La exposición prolongada a niveles elevados de estos ácidos grasos libres (derivados de la lipólisis en los adipocitos o de la hidrólisis de las lipoproteínas), puede tener efectos negativos sobre la función de las células beta. Pueden provocar una atenuación en la secreción de insulina (estimulada por la glucosa) y conducir a la acumulación de metabolitos tóxicos de ácidos grasos en las células de los islotes (esta es la llamada lipotoxicidad) [70], [71]. De hecho las lipoproteínas están tomando un papel relevante en los últimos tiempos como un efector implicado en esta lipotoxicidad [72].

Sin embargo, existen trabajos *in vitro* y en modelos animales, que indican que los efectos deletéreos de los lípidos en las células beta se producen sólo en la presencia de hiperglucemia. En consecuencia, los ácidos grasos cuando están elevados, y en hiperglucemia no se metabolizan en las mitocondrias y se desvían hacia las vías de esterificación con la consiguiente acumulación de ésteres de acil-CoA de cadena larga en el citoplasma. Es lo que denominaríamos la glucolipotoxicidad [73].

B.2.6. Autoinmunidad e inflamación

Parece evidente la implicación de estos dos fenómenos en el desarrollo de la DM2. Al menos, eso parecen indicar ciertos estudios que hablan de alrededor de un 10% de individuos con DM2 que presentan autoanticuerpos específicos de la diabetes. Es mayor porcentualmente en jóvenes y en los grupos de pacientes con menores índices de grasa [74].

De esta manera un mecanismo patogénico que lleva a la inflamación de los islotes en DM2 comienza con el estrés crónico metabólico (altos niveles de glucosa en la sangre y

ácidos grasos libres), que induce una respuesta inflamatoria en los islotes pancreáticos, consistentes en la producción de citoquinas y quimiocinas [75].

B.2.7. Adipocinas

La adipocinas son péptidos similares a las hormonas, liberadas por el tejido adiposo con un papel en el eje "adiposo- insular". Algunas como la leptina, resistina y apelina actúan como citoquinas pro-inflamatorias con un carácter lesivo para las células beta. Existen otras que tienen efectos protectores sobre la función de las células beta y por tanto de su supervivencia, como son la adiponectina y visfatina [76].

B.2.8. Péptido amiloide

Los mecanismos por los que la formación de amiloide se relaciona con la disfunción de las células beta y su muerte no son bien conocidos. Sin embargo, se ha observado una importante correlación entre estos depósitos y la reducción de la masa beta en la DM2, así como un aumento de la apoptosis en las células beta [77].

B.2.9. Factores genéticos

Un importante concepto a recordar es que la diabetes es una enfermedad con un importante componente hereditario. El patrón genético de la DM2 es de carácter poligénico. No se encuentra suficientemente definido el componente cualitativo que tendría cada uno de los genes señalados en dicho patrón. Un papel aparte mostrarían la diabetes MODY y sus subtipos y otros tipos de diabetes monogénicas (mitocondrial, neonatal...etc). Dentro de los

Genes	Risk Allele Effects*
<i>ADAMTS9</i>	Unknown
<i>CAPN10</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion; decreased proinsulin conversion; decreased whole-body insulin sensitivity
<i>CDC123/CAMK1D</i> [†]	Decreased insulin secretion
<i>CDKAL1</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion; decreased proinsulin conversion
<i>CDKN2A/B</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion
<i>ENPP1</i> [†]	Decreased whole-body insulin sensitivity; decreased insulin secretion
<i>FTO</i>	Increased overall fat mass; increased energy intake; decreased cerebrocortical insulin sensitivity
<i>HHEX</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion
<i>HNF1B (TCF2)</i>	Unknown
<i>IGF2BP2</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion
<i>JAZF1</i> [†]	Decreased insulin secretion
<i>KCNJ11</i> [†]	Decreased insulin secretion; decreased glucose-dependent suppression of glucagon secretion
<i>KCNQ1</i> [†]	Decreased insulin secretion; decreased incretin secretion
<i>MTNR1B</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion
<i>NOTCH2</i>	Unknown
<i>PPARγ</i>	Decreased whole-body insulin sensitivity; decreased adipose tissue sensitivity; decreased insulin clearance
<i>SLC30A8</i> [†]	Decreased glucose-stimulated insulin secretion; decreased proinsulin conversion
<i>TCF7L2</i> [†]	Decreased incretin-stimulated insulin secretion; decreased proinsulin conversion; decreased whole-body insulin sensitivity; decreased hepatic insulin sensitivity
<i>THADA</i>	Unknown
<i>TSPAN8/LGR5</i> [†]	Decreased insulin secretion
<i>WFS1</i> [†]	Decreased incretin-stimulated insulin secretion

Tabla 2. Genes más importantes implicados en la DM2 [78].

genes estudiados relacionados podrían destacarse los genes TCF7L2 y KCNJ11 (Tabla 2).

B.3. MASA CELULAR BETA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

La pérdida de la masa beta juega también un importante papel en la patogénesis de DM2. Estudios cadavéricos en humanos, diabéticos y no diabéticos, han demostrado una disminución de la masa beta en el primer grupo [79].

En humanos obesos no diabéticos se produce un aumento de la masa para compensar los requerimientos de insulina por la resistencia que se produce a esta en los tejidos periféricos, como sucede en el músculo esquelético e hígado principalmente. Este incremento es a expensas de un aumento de la proliferación y de la neogénesis de islotes [80].

Los mecanismos de compensación que inducen el aumento de la masa de células beta son numerosos y provienen de los diferentes tejidos afectados. Se ilustran a continuación en el siguiente gráfico (Figura 15).

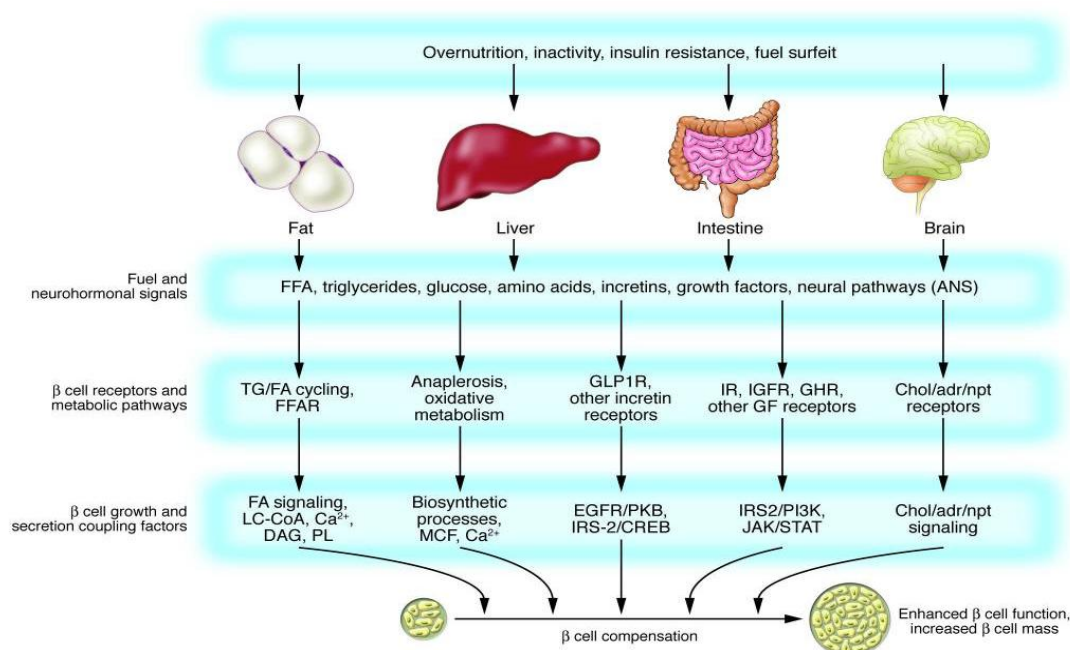


Figura 15. Mecanismos de compensación de las células beta tras la resistencia insulínica [81].

Una vez superada la capacidad de compensación del organismo, se ha observado que pacientes obesos diabéticos reducen su masa beta a expensas de un incremento de la apoptosis [82] (Figura 16). Por otro lado existe discordancia en relación al proceso de proliferación, hay autores que afirman que la replicación y formación de islotes no varía [83], sin embargo otros concluyen que el aumento de la apoptosis viene acompañada además con una disminución de la proliferación de las células beta [80]. Por último algunos

autores también proponen en modelos de ratas diabéticas que el mecanismo fundamental es el descenso de neogénesis en las células beta [84].

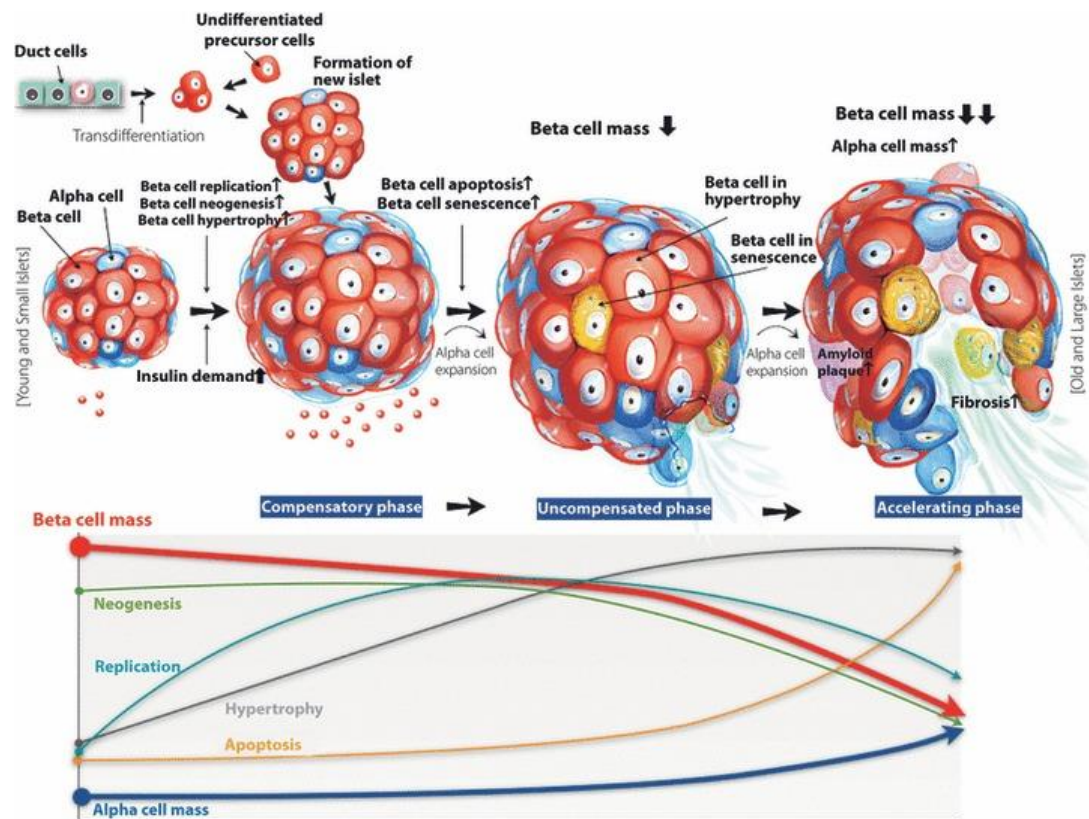


Figura 16. Hipótesis de las alteraciones morfológicas de los islotes y las reducciones de las células β en pacientes diabéticos [82].

C. OBESIDAD

C.1. INTRODUCCIÓN

La grasa es un componente normal del cuerpo humano que se almacena en el tejido adiposo. La obesidad puede definirse como una condición que implica un acúmulo excesivo de grasa en la medida que la salud y el bienestar se ven afectados. La grasa corporal se puede determinar in vivo de diferentes formas; usando técnicas precisas de laboratorio o técnicas de estimación simples para poderse aplicar en estudios de campo. Para los estudios de población, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define los valores de corte para la obesidad basado en el índice de masa corporal (IMC/BMI), que es el cociente entre el peso en kilogramos y la altura al cuadrado en metros (kg/m^2) (Tabla 3). En general, para los adultos, un IMC superior a 25 kg/m^2 , se considera sobrepeso, si el valor es superior a 30 kg/m^2 se le considera obeso. Sin embargo, la relación entre el porcentaje de grasa corporal y el IMC es diferente entre los grupos étnicos. Como consecuencia, los puntos de corte para el sobrepeso y la obesidad basados en el IMC serán diferentes [85].

	Obesity class	BMI (kg/m^2)
Underweight		<18.5
Normal		18.5–24.9
Overweight		25.0–29.9
Obesity	I	30.0–34.9
	II	35.0–39.9
Extreme obesity	III	≥ 40.0

Tabla 3. Clasificación de la obesidad según el IMC/BMI [86].

La obesidad es reconocida como una de las amenazas más graves para la salud pública de nuestro tiempo. Las estrategias de intervención actuales que se han destinado a frenar la propagación de la obesidad han sido ineficaces. Parece ser necesario redirigir las intervenciones a distintos niveles. Los factores genéticos, biológicos y psicológicos interactúan con las condiciones ambientales para promover la inactividad y la mala nutrición, resultando todo ello en el aumento del peso generalizado. La investigación epidemiológica ha demostrado la importancia de los determinantes sociales, como el género, la edad, el nivel socioeconómico y la etnia sobre la salud. Existe un creciente consenso sobre la necesidad de cambiar el paradigma para abordar la prevalencia de la obesidad a dominios sociales más allá de la persona [87].

Actualmente a nivel mundial se considera que existe alrededor de un billón y medio de personas que padecen de sobrepeso y obesidad grado 1 [88]. En los EE.UU., Reino Unido y Australia, la prevalencia de obesidad se ha más que duplicado en los últimos 25 años. Actualmente el 67% de la población de EE.UU padece de sobrepeso o son obesos. No

son mucho mejores las cifras en los países europeos, oscilando la prevalencia entre el 40% y el 50% [89]. Se ha estimado que en 2010 el número de obesos mayores de 60 años en EE.UU era de unos 20 millones. Las estimaciones de obesos ancianos para 2015 en la Unión Europea son de 32 millones [90].

La obesidad está asociada con un mayor riesgo de DM2, hipertensión arterial, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, trastornos musculoesqueléticos (como la artrosis), ciertos tipos de cánceres y un aumento de la mortalidad. Estas patologías conllevan enormes costes sanitarios [89]. En este sentido niveles de insulina e IMC han demostrado ser buenos predictores independientes de enfermedad cardiovascular [91].

La obesidad grado 1 parece no estar asociada con una mayor mortalidad, lo que sugiere que el exceso de mortalidad en la obesidad es debido a niveles más altos de IMC. Es más, parece que el sobrepeso se asoció con un número significativamente menor de mortalidad por cualquier causa [92]. Existen, sin embargo, otros trabajos que ponen en duda que el sobrepeso sea una condición de menor mortalidad, aunque coincide en el resto de los resultados: a más IMC, más mortalidad [93]. En concordancia con estos datos, a mayor pérdida de peso existe un aumento de las expectativas de vida [94].

La obesidad se considera junto a la DM2 como uno de los rasgos definitorios clínicos del síndrome metabólico o síndrome X, este engloba una constelación de trastornos bioquímicos y físicos que incluyen además la dislipemia e hipertensión asociados a un estado protrombótico y pro-inflamatorio [95].

C.2. OBESIDAD Y DIABETES

Existe una importante correlación entre el número de pacientes con DM2 y la existencia de obesidad en estos. Este binomio acontece en algunos estudios en un rango que supera el 30-50 % [96].

Existe una importante asociación entre obesidad (a nivel del tejido celular subcutáneo y visceral) y la resistencia a la insulina, correlacionándose de forma estrecha. La obesidad provoca un incremento en la secreción de insulina como consecuencia de un aumento de su resistencia a la acción de la misma a nivel periférico [97]. Con el aumento de peso, la masa de células beta sufre una expansión como mecanismo de compensación [98]. Este mecanismo compensatorio llegado un punto es incapaz de sostener el incremento necesario de la población de células beta, dándose un estado de agotamiento en la población de células beta que precede a una disminución de la misma (Figura 17) [99].

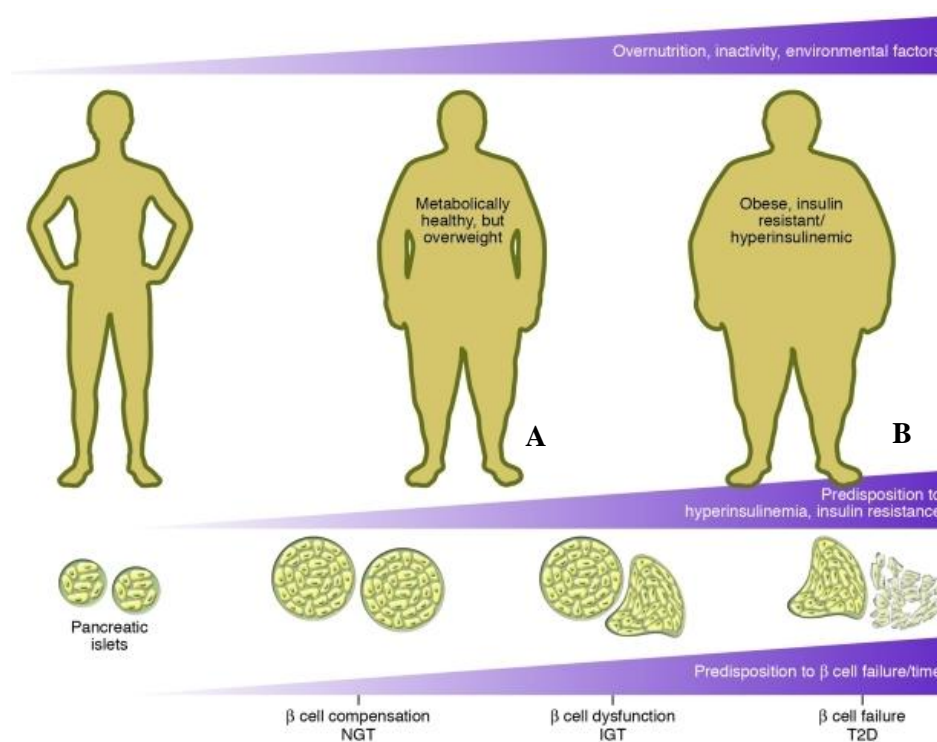


Figura 17. Compensación pancreática con el aumento de peso [98]. (A) Individuo metabólicamente sano pero con sobrepeso. (B) Individuo obeso con insulinoresistencia e hiperinsulinemia.

El incremento de tejido adiposo produce un aumento de los ácidos grasos a nivel sanguíneo secundario a un aumento de la lipólisis. Esto conduce a un estado de lipotoxicidad que, asociado al incremento de citoquinas proinflamatorias secretadas tanto por el tejido adiposo como en el hígado, provocan la incapacidad de este último y de los

tejidos periféricos para utilizar la insulina. Dan lugar a un estado de hiperinsulinismo y a su resistencia en los mismos (Figura 18) [100].

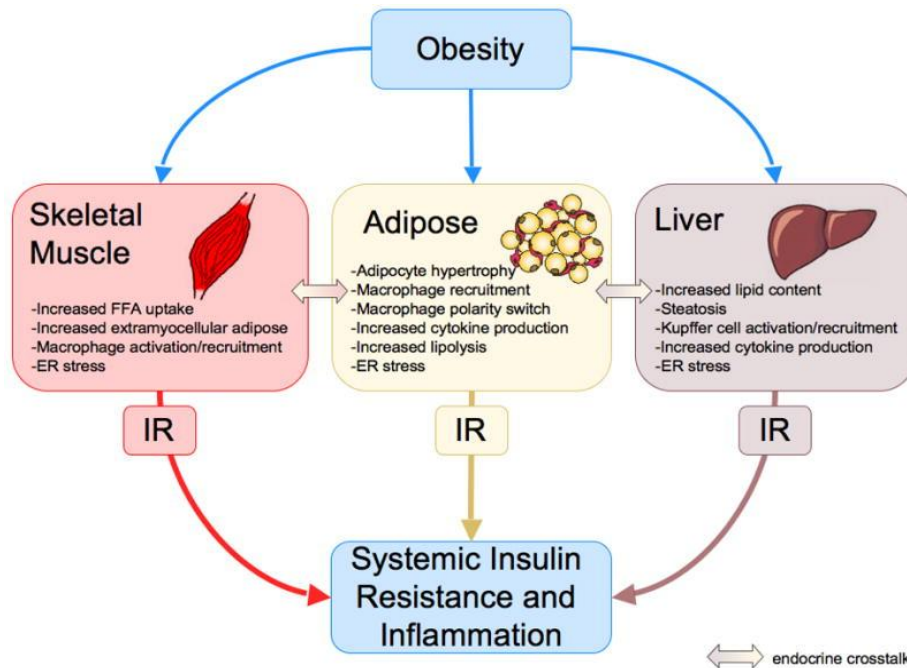


Figura 18. Obesidad, desarrollo de la inflamación y la resistencia a la insulina. (IR resistencia insulínica, ER retículo endoplásmico) [97].

Se puede afirmar por tanto que existe una importante relación entre obesidad, intolerancia a la glucosa y DM2. Así pues, un incremento del IMC da como consecuencia un incremento de la incidencia de la intolerancia glucémica y diabetes tanto en hombres como mujeres [101].

La pérdida de peso, por contra, provoca descenso del hiperinsulinismo, disminuyendo la resistencia periférica y la producción hepática de glucosa [102].

Dentro de los mecanismos relacionados con la pérdida de peso que mejoran los niveles glucémicos y la diabetes se encuentran:

- Incremento de la sensibilidad insulínica.
- Disminución de la lipotoxicidad.
- Cambios en las hormonas intestinales y de las incretinas.

D. CIRUGÍA BARIATRICA

D.1. BREVES RESEÑAS ANATÓMICAS Y FUNCIONALES DEL TUBO DIGESTIVO

El uso de ratas para la realización de estudios experimentales a nivel mundial es bien conocido. El objetivo principal, tras la realización de técnicas de CB en esta especie, es conocer los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos y con ellos extrapolarlos al humano para conocer aquellas incógnitas que éticamente no pueden ser contemplados en estudios sobre los mismos.

Las técnicas de CB implican la manipulación directa de algunos órganos; estómago, yeyuno e íleon. Por tanto, es de obligado cumplimiento conocer las diferencias existentes entre la rata y el humano. Inicialmente, el tubo digestivo de ambas especies es similar. Igualmente alojados en la cavidad abdominal, envuelto en una serosa –peritoneo visceral- y separado del compartimento posterior o retroperitoneo. De similar forma, la rata presenta un gran saco gástrico tras el tubo esofágico que procede de la faringe. Un claro esfínter pilórico separa la luz estomacal del duodeno. Las tres porciones de intestino delgado están claramente delimitadas. La primera porción el duodeno, fijada con una lámina de coalescencia, enmarca al páncreas y deja libre en su mesenterio las dos porciones restantes; el yeyuno e íleon posteriormente. El intestino grueso, libre y movable en sus porciones ascendente y descendente, se observan claramente *de visu* tras un abocamiento en forma valvular de la porción final del íleon.

D.1.1. Estómago

La rata presenta varias diferencias en relación al humano:

- La entrada del esófago al estómago es algo más central, además de encontrarse más horizontal.
- El estómago se divide en dos porciones bien diferenciadas: estómago no glandular (fore-stomach, *pars cardiaca*, *saccus cecus* ó *rumen*), y el glandular compuesto por la *pars fúndica* y *pylorica*). El primero presenta epitelio escamoso estratificado y el segundo tejido glandular como su nombre indica. Ambos se encuentran separados por una membrana mucocutánea conformando una línea de transición (*margo plicatus*). Externamente el estómago no glandular posee un aspecto más pálido y bien diferenciado *del fundus-antro* [103] [6]. En humanos las tres porciones (*fundus*, *cuero* y *antro*) son glandulares. Su orientación espacial es más vertical

- Dadas las características anatómicas del estómago de los roedores cabe destacar que, a diferencia del humano, carecen de la capacidad de vomitar. Esto es debido al repliegue del tejido glandular a nivel de la línea de transición contigua a la entrada del esófago [5] (Figura 19).

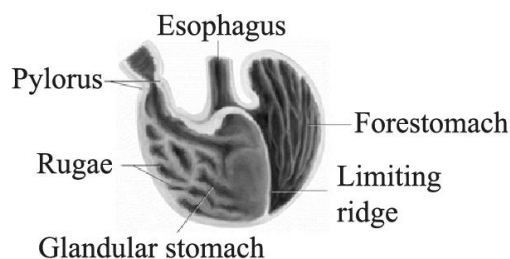


Figura 19. Características macroscópicas del estómago de la rata [6]

D.1.2. Yeyuno e íleon

Las características más relevantes que hay que destacar son las siguientes:

- Porcentualmente el intestino delgado es equiparable al humano (18%), la diferencia la marcan los porcentajes de cada segmento.
- El yeyuno mide alrededor de los 90-100 cm, siendo por tanto el 90 % de todo el intestino delgado; en humanos porcentualmente es mucho menor llegando a ser el 38-40%.
- El íleon en las ratas tan sólo comprende el 2.5-3,5%, es decir solo unos pocos centímetros (alrededor de 3cm) (Figura 20) [104].

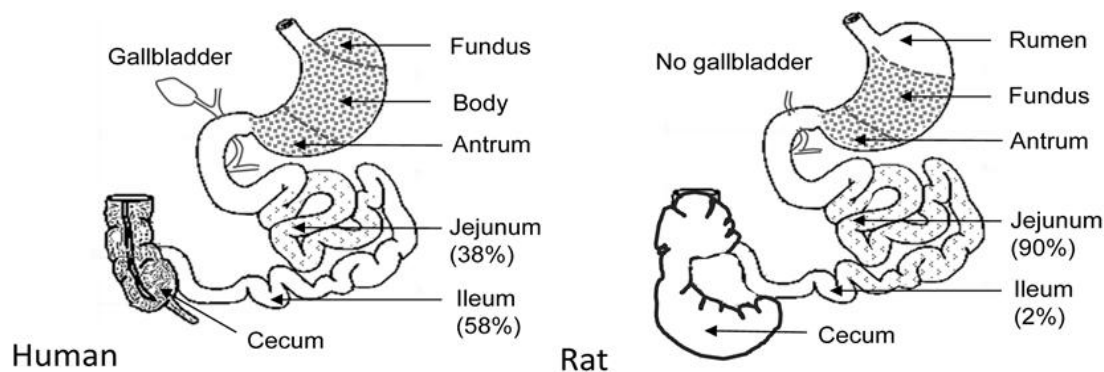


Figura 20. Diferencias macroscópicas de ambas especies [104]

D.2. INTRODUCCIÓN

El término “bariátrica” deriva de la palabra griega “*barys*” o “*baros*”, que significa “pesado”, “pesadez”, “peso que abruma”; y la palabra latina “*iatria*”, de “*iatrikos*”, que significa “relativo al tratamiento médico”. El término “bariátrica” se asocia con obesidad. Pese a que se le reconoce etimología grecolatina, diversas teorías sitúan el origen de esta palabra en el idioma hebreo, basado en su utilización en las antiguas escrituras [105].

El tratamiento quirúrgico de la obesidad es la modalidad de tratamiento más eficaz comparándola con el tratamiento convencional, consiguiéndose tasas de éxito más elevadas y duraderas [89, 106]. Además es muy eficaz en la mejora o la resolución de muchas comorbilidades relacionadas con la obesidad. Existen costos indirectos relacionados con la obesidad, como son, los relacionados con una mayor frecuencia de bajas por enfermedad en el ámbito laboral, tasas de desempleo más altas y en general una menor productividad [107].

Las indicaciones de cirugía bariátrica clásica han sido: sujetos con obesidad grado III ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$) y entre 18 y 65 años; obesidad con una duración mayor a 5 años y con tratamiento previo fallido; obesidad primaria, es decir no derivada de enfermedad endocrina, drogas, etc.; y ausencia de trastornos psicológicos y psiquiátricos [117].

También se indica en el caso de sujetos con $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ y la presencia de comorbilidades tales como: DM2, hiperlipidemia, hipertensión arterial, síndrome de apnea del sueño, insuficiencia cardíaca congestiva o artritis de cadera, rodilla y pie.

En marzo de 2010 esta guía fue revisada recomendando incluir diabéticos tipo 2 con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ y comorbilidad [108], así como el uso de la técnica de banda gástrica ajustable en pacientes con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ y comorbilidad [109].

La Federación Internacional para la Cirugía de la Obesidad y Enfermedades Metabólicas (IFSO), en un nuevo consenso en el congreso Asia-Pacífico (IFSO-APC Federación Internacional de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Asian Pacific Chapter) realizó las siguientes declaraciones en su último consenso en 2011[110]:

La CB debe ser considerada para el tratamiento de la obesidad en los pacientes asiáticos con $IMC \geq 35$ con o sin comorbilidades. En segundo lugar, la cirugía metabólica bariátrica / gastrointestinal debe considerarse para el tratamiento de la DM2 o síndrome metabólico en los pacientes que no están adecuadamente controlados con cambios en el estilo de vida y su tratamiento médico en los pacientes asiáticos con $IMC \geq 30$. Por último,

el abordaje quirúrgico puede ser considerado como una alternativa secundaria para tratar la DM2 ó síndrome metabólico mal controlados en pacientes asiáticos con $IMC \geq 27,5$.

D.3. TÉCNICAS DE CIRUGÍA BARIÁTRICA

Las diferentes técnicas bariátricas alteran la conformación anatómo-fisiológica del tubo digestivo pretendiendo con ello modificar el eje enteroinsular. Se pretende provocar la pérdida de peso y posteriormente mantenerlo mediante la promoción de la saciedad temprana. Sin embargo, la pérdida de peso después de la CB no se explica solo por la restricción de volumen y la actividad malabsortiva derivada de la misma. La CB provoca cambios significativos en el perfil neurohormonal, contribuyendo a la pérdida y mantenimiento del peso de manera sostenida a través de los cambios en la regulación de la ingesta y la saciedad [111].

La CB abarca un grupo diverso de procedimientos quirúrgicos. Tradicionalmente se han clasificado en técnicas restrictivas, malabsortivas o mixtas de acuerdo a su mecanismo de acción.

La banda gástrica ajustable laparoscópica (BGAL) y el by-pass gástrico en y de Roux (BG) son las técnicas más usadas. La gastrectomía vertical (GV), en manga ó sleeve gastrectomy es cada vez más popular, siendo la primera opción ya en numerosos centros [112].

D.3.1. Técnicas restrictivas

Son aquellas que reducen la ingesta al disminuir el volumen gástrico, se incluyen la BGAL y la GV.

- La BGAL (Figura 21) es el procedimiento menos invasivo, es completamente reversible y tiene la mortalidad más baja. Es una banda inflable de silicona que se coloca alrededor del estómago inmediatamente por debajo de la unión gastroesofágica. Esta banda está conectada a un puerto subcutáneo que se utiliza para ajustarla. La banda comprime a dicho nivel generando una sensación de saciedad temprana con disminución de la ingesta.

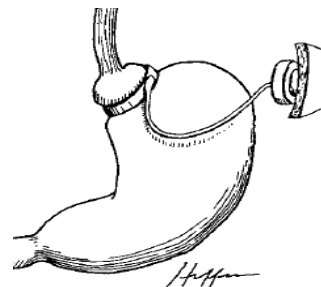


Figura 21. Obsérvese el volumen remanente [86]

-La GV (Figura 22) elimina el 60-80% del estómago a lo largo de la curvatura mayor para dejar una restricción en 'manga' del estómago a lo largo de la curvatura menor. Originalmente, fue el primer paso de la derivación biliopancreática con switch duodenal (ver abajo), en súperobesos o de alto riesgo. Hoy se utiliza cada vez más de primera elección como procedimiento independiente.



Figura 22. Extirpación de gran parte del estómago.

D.3.2. Técnicas malabsortivas

Provoca una disminución de la absorción de los nutrientes. En éste grupo encontramos el *switch* duodenal/cruce duodenal (CD) y la derivación biliopancreática (DBP) entre otros.

La DBP y la derivación biliopancreática con cruce duodenal (DBP/CD) son operaciones que conducen a la malabsorción. Condicionan que los alimentos se mezclen con las secreciones biliopancreáticas de manera tardía y además de producirse en un segmento corto de intestino delgado. De esta forma, sin el pre-procesamiento de las sales biliares y las enzimas pancreáticas, dichos nutrientes no se pueden absorber de forma habitual. El by-pass yeyuno-ileal, técnica malabsortiva, dejó de utilizarse por el importante número de complicaciones que asociaba (Figura 23).

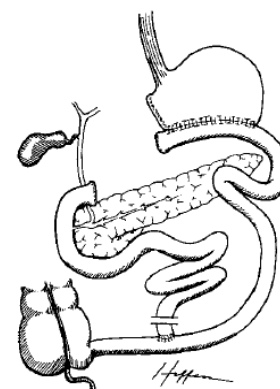


Figura 23. Por el estómago remanente no se le considera restrictiva [86]

- La DBP, es una gastrectomía parcial dejando una bolsa gástrica de unos 400 ml reduciéndose el asa intestinal (asa común) donde se produce la digestión en tan sólo 50 cm de intestino delgado.

- La DBP/CD (Figura 24), es una GV en la cual el píloro permanece intacto. El duodeno es desconectado mediante una sección transversal del mismo. El estómago es anastomosado al intestino delgado distal (el "switch duodenal"), creándose un asa alimentaria corta. El asa biliopancreática es larga anastomosándose a unos 75-100 cm de la válvula ileocecal, por lo que la digestión y la absorción se produce sólo en el asa común corta.

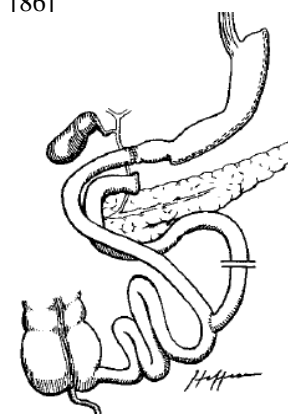


Figura 24. Obsérvese la preservación del píloro

D.3.3. Técnicas mixtas

Son una combinación de las técnicas restrictivas y malabsortivas. Destaca el BG como la técnica más ampliamente utilizada.

En la realización del BG (Figura 25) se configura una bolsa gástrica proximal de 20 a 30 ml inmediatamente pasado el cardias, esta se anastomosa al yeyuno formando una de las ramas de la Y de Roux, correspondiendo al asa alimentaria. El duodeno junto al yeyuno se encuentran excluidos del paso de los alimentos (asa biliopancreática) conformando la otra rama de la Y de Roux. Esta asa alimentaria se anastomosa a unos 75-150 cm de la válvula ileo-cecal, conformando el asa común donde se lleva a cabo la mezcla y digestión de los nutrientes.

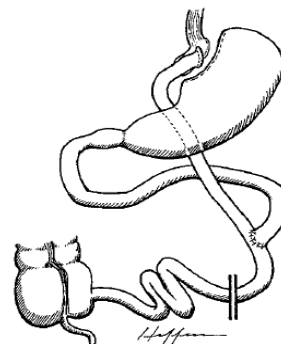


Figura 25. La capacidad gástrica al igual que la banda es muy limitada [86]

D.4. CIRUGÍA BARIÁTRICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

El objetivo de un paciente obeso es perder peso y mantenerlo en un rango de normalidad a lo largo del tiempo. De igual manera, el objetivo de un paciente con diabetes es poseer unos niveles normales de glucemia durante todo el día sin necesidad de medicación. En relación a estos dos objetivos, el papel de la CB se ha ido incrementado en los últimos años [110]. La definición de remisión completa de la DM2 tras CB sería la vuelta a los valores "normales" en el metabolismo de la glucosa (hemoglobina glicosilada en rango de normalidad (<6), glucosa en ayunas <100 mg/dl [5,6 mmol/l]) y una duración mínima de un año en ausencia de tratamiento farmacológico activo [113].

En 1955 fue quizás la primera publicación relativa a la cirugía metabólica sin consciencia de la misma. La mejoría de la DM2 se observó tras gastrectomía subtotal por cáncer gástrico [114].

Aunque la CB fue designada solamente para facilitar la pérdida de peso, desde los años 70 se comenzaron a observar que de forma anecdótica se producían remisiones de la DM2 durante el postoperatorio. En 1995, Pories et al. describieron una remisión de un 83% de la DM2, sin necesidad de medicación, en un total de 146 pacientes tras CB y un seguimiento de 14 años. Como dato interesante, la remisión de la DM2 se produjo antes de que la pérdida de peso fuese significativa [115].

Mediante estrategias terapéuticas médicas se consigue reducir el IMC de los pacientes y el control glucémico. Sin embargo, ninguna estrategia es tan eficaz consiguiendo los resultados de reducción, mantenimiento de peso y reversión de la diabetes, medido en cifras glucemias óptimas y/o abandono de la medicación como las

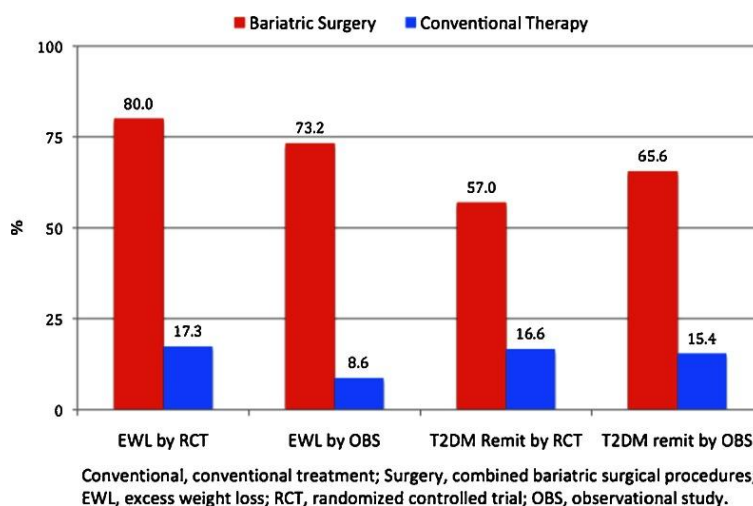


Figura 26. Porcentaje de pérdida de peso y remisión de DM 2 en estudio randomizados/ observaciones comparando terapias convencionales y tras cirugía bariátrica [106].

técnicas bariátricas mixtas [89] [106, 116] (Figura 26). En este sentido la técnica restrictiva (GV) también ha demostrado la reversión de la diabetes y disminución del peso de forma eficaz en mayor porcentaje que los pacientes tratados con medidas higiénico-dietéticas [100, 106, 117].

No obstante los resultados a largo plazo están todavía por determinar. Existe controversia en torno a cuál de las técnicas bariátricas tiene mayor capacidad de reversión de la DM2 (Tabla 4). A pesar de ser ambas eficaces, los porcentajes varían según las publicaciones. Así pues, en algunas revisiones parece ser más eficaz el BG en relación a la GV [118-120], sin embargo, otros autores no aprecian diferencias entre ambas en porcentajes de reversión de la DM2 en obesos mórbidos [121, 122].

Comparison of results obtained through different surgical techniques					
	Decrease of BMI (average) (kg/m ²)	Improvement in (percentages)			
		Hyperlipidemia		Hypertension	T2DM
		Cholesterol	Triglycerides		
LAGB	10.4	78	77	72	80
VBG	14.2	39	71	81	89
GBP	16.7	94	91	87	91
BPD	17.9	87	100	92	88

Tabla 4. Comparación de resultados obtenidos de las diferentes técnicas quirúrgicas. LAGB, laparoscopic adjustable gastric banding; VBG, vertical banded gastroplasty; GBP, gastric bypass; BPD, biliary-pancreatic diversion [123].

D.5. HORMONAS GASTROINTESTINALES, CIRUGÍA BARIÁTRICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

¿Qué es una incretina?

La lista de sustancias sintetizadas y liberadas por las distintas porciones del aparato digestivo es amplia. Entre los factores hormonales más importantes implicados en la regulación de la secreción de insulina tenemos a las incretinas (GLP-1 y GIP), la grelina y sus derivados peptídicos prorelina (acilgrelina, desacilgrelina y obestina), polipéptidos gastrointestinales (PYY, péptido YY), NPY (neuropéptido Y), PPY (polipéptido pancreático), colecistoquinina (CCK), gastrina, neuropéptidos hipotalámicos, leptina y cannabinoides.

La reversión precoz de la DM2 tras un procedimiento bariátrico se produce a menudo antes de la pérdida de peso. Si bien los mecanismos responsables no están del todo establecidos, existen diferentes teorías que intentan explicarlo.

Por una parte se encuentra la teoría del intestino proximal (foregut exclusion theory) (Figura 27), que defiende que la cirugía produciría un descenso de factores que son los causantes de la resistencia insulínica, consiguiéndose el efecto contrario: un aumento de la secreción y estimulación de la secreción de insulina debido a la ausencia del paso de los alimentos a nivel duodenal-yeyuno proximal. Lo que es lo mismo, esta teoría promueve que la exclusión del duodeno y yeyuno proximal al paso de nutrientes puede evitar la secreción/estimulación de una señal (señales anti-incretinas), que promueve la resistencia a la insulina y por tanto contribuyendo a la aparición de la DM2. Un candidato mediador de la teoría de la exclusión intestino anterior es el GIP (incretina), secretado por las células K en el duodeno en respuesta a la absorción de nutrientes [124,125].

El sistema incretina puede llevar a fenómenos de hipoglucemia. Es razonable, pues, considerar un sistema "anti-incretina", contrarregulando y llevando a cabo acciones opuestas a la prevención de la hipoglucemia. Un equilibrio entre las incretinas y anti-incretinas sería necesario para mantener la normoglucemia. Un cambio hacia el exceso del efecto anti-incretina causaría DM2 por la inadecuada secreción de insulina y la alteración de su sensibilidad. Actualmente no hay candidatos para asignárseles ese papel anti-incretina [124].

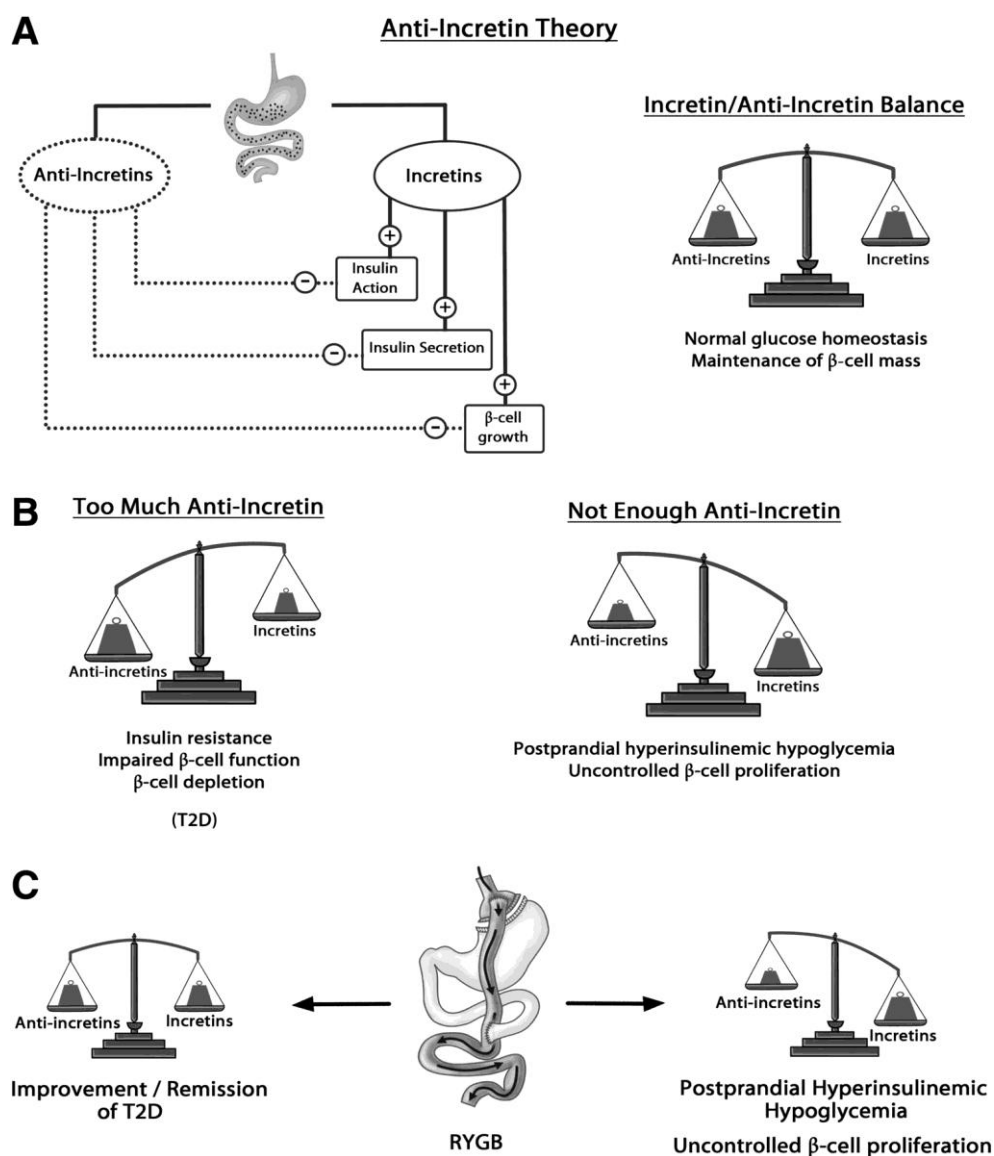


Figura 27. Resumen esquemático de la Tª anti-incretinas. Diferentes situaciones clínicas en base a su desequilibrio y tras la cirugía de BG [126].

En contraposición con la anterior teoría aparece la teoría del intestino distal (hindgut hypothesis). Esta hipótesis promulga que aquellas cirugías que presentan bypass y un contacto prematuro de los alimentos/quimo a nivel del intestino distal donde se encuentran las células L, aparece un aumento de la liberación de GLP-1, PPY, PYY junto a otras enterohormonas, contribuyendo a la mejora de la secreción de insulina y su acción [124], así como a una saciedad precoz y una disminución de la ingesta [111].

De esta manera la elección del procedimiento quirúrgico, la duración y la gravedad de la diabetes, entre otros factores, parecen determinar la magnitud y la duración de los cambios en las hormonas intestinales (GLP-1, GIP, la grelina, péptido YY, etc.) (Tabla 5) y sus consiguientes efectos sobre la secreción y sensibilidad de la insulina [127].

A pesar de lo comentado se desconocen muchas de las acciones de las enterohormonas, así como su papel en la homeostasis de la glucosa. Es necesario seguir investigando la interacción tan compleja que se produce a nivel endocrino/autocrino y paracrino en el tracto digestivo [132, 133].

Advantages of hormonal bariatric procedures							
	Secreted from	Acts on	Effect on satiety	Roux-Y gastric bypass	DS/BPD	Sleeve gastrectomy	Adjustable gastric band
Ghrelin	Fundus	V, BS, HT	↓	↓	↓	↓	↑
GLP-1	L cells	V, BS, HT	↑	↑	↑	↑	No Δ
GIP	K cells	β-cells	?	↓ or no Δ	↓ or no Δ	↑	No Δ
PYY	L cells	V, BS, HT	↑	↑	↑	↑	No Δ
Pancreatic polypeptide	F cells	V, BS	↑	↑	↑	↑	?
Amylin	B cells	BS, HT	↑	↓	?	↑	No Δ
CCK	I cells	V, BS, HT	↑	No Δ	?	↑	?
Oxyntomodulin	L cells	HT	↑	↑	?	?	?

V vagus, *BS* brain stem, *HT* hypothalamus

Tabla 5. Cambios en las hormonas gastrointestinales después de distintos procedimientos bariátricos y su efecto sobre la secreción de insulina. BPD, biliopancreatic diversion; DS, duodenal switch; GIP, glucose-dependent insulintropic peptide; GLP-1, glucagon-1, PYY, polipéptido YY; CCK, colecistoquinina [128], [129].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS CONCEPTUAL

Las técnicas de cirugía bariátrica en un modelo de ratas Wistar sanas inducirán la adaptación del islote pancreático y modificarán los parámetros funcionales e histológicos del páncreas endocrino.

HIPÓTESIS OPERATIVA

Las distintas técnicas de cirugía bariátrica, en función del patrón adaptativo que condicione -malabsortivo, restrictivo, o mixto- modificarán de diferente manera los resultados sobre el páncreas.

Según la técnica de cirugía bariátrica se deben observar diferentes cambios en el estatus del páncreas endocrino, bien a niveles funcionales o histológicos, o en ambos aspectos a la vez.

De forma consustancial a estos cambios morfofuncionales que puedan estar ocurriendo en el páncreas, los animales de experimentación mostrarán durante el periodo de supervivencia signos fisiológicos de su adaptación a la cirugía sufrida, desde el punto de vista de sus valores fenotípicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer los mecanismos responsables que justifiquen la mejoría y/o normalización del metabolismo hidrocarbonado que acompaña a la cirugía bariátrica.

Establecer el comportamiento de la célula beta pancreática, una vez que se han activado las vías metabólicas adaptativas tras sufrir las diversas técnicas de CB, en un modelo animal ausente de factores patológicos, como son, la diabetes y la obesidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer la cantidad de alimentos ingeridos de los distintos grupos objetivando de esta manera la influencia sobre el hábito alimentario de los animales según el grupo al que pertenezcan.

Valorar los cambios de peso durante su seguimiento y conocer si las técnicas aplicadas provocan cambios en la tasa de ganancia ponderal en cada grupo experimental frente a la curva de ganancia estándar de una rata Wistar control.

Cuantificar las glucemias basales como variable de las adaptaciones fisiopatológicas que los animales estén realizando frente a la cirugía sufrida.

Valoración funcional de la capacidad de respuesta de la célula beta mediante pruebas de estrés, como es, el test de sobrecarga intraperitoneal de glucosa, cuantificando las glucemias e insulinemias basales.

Comprobar las variaciones de la resistencia insulínica periférica que puedan estar ocurriendo en las técnicas realizadas, ya que siendo esta uno de los dos pilares claves que definen a la DM2 podamos centrar el foco sobre cuál de los mecanismos tiene mayor preponderancia en la resolución de dicha entidad clínica.

Objetivar los mecanismos celulares de adaptación que acontecen en la célula beta pancreática después de las distintas cirugías. Para ello hemos de determinar la histomorfometría de la masa beta, la capacidad de proliferación, neogénesis y el grado de apoptosis. Con los datos previos, podremos correlacionar todos éstos parámetros citológicos con la técnica quirúrgica aplicada.

Por último, interrelacionar los cambios fenotípicos durante el seguimiento de los grupos experimentales y los hallazgos en el comportamiento de las células beta.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Cirugía. Estadios pre, intra y postquirúrgicos

- Isoflorano (Forane[®] Solución 100 ml Abbott).
- Material de sutura (Vicryl[®]-Ethicon- y Prolene[®] -Braun- de diferentes diámetros).
- Caja de material quirúrgico estándar; pinzas, mosquitos, tijeras y portas. Gasas estériles 7,5x7,5 cm (Texpla[®] quirúrgico). Alcohol 98 °C (Cinfa[®]). Clorhexidina (Hibiscrub[®]).
- Suero fisiológico (Braun[®] - Solución isotónica de cloruro sódico al 0,9%).
- Glucómetro (Accucheck optimun[®]).
- Báscula de precisión. Ohaus serie Pioneer[®]. Modelo PA 3102.
- Batido de reposición de dieta postoperatoria. Resource[®] protein 200 ml. Nestle nutrition.

Fijación de material biológico

- Ácido Pírico (Trinitrofenol, ácido nitroxántico), (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Parafina de punto de fusión media. Histoplast[®] Sintético (Pellets Blancos).
- Formalina 4% (Formaldehído, formol, aldehído fórmico, metanol). Panreac Química Sau[®]. Krape S.A.
- Alcohol absoluto; alcoholes gradados (Sigma-Aldrich).
- PBS (Tampón fosfato salino, PH 7.2-7.4).
- Bomba de perfusión durante sacrificio.
- Hidrato de cloral (Aquachloral[®]).
- Heparina sódica (Sanofis-Aventis[®]).

Estudio del número de células beta

- Anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes Eugene, OR, USA).
- Tritón X-100 (0,2 %) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- STF (Suero Ternera Fetal) 4% V/V
- PBS.
- DAPI (4'-6'Diamino fenil indol) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).
- Medio de montaje DABCO (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).

Estudio de proliferación

- Tampón Citrato (pH 6.0)
- Anticuerpo de ratón IgG monoclonal anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón anti-insulina conjugado con fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes Eugene, OR, USA).
- Anticuerpo IgG policlonal de conejo anti Ki-67 (Abcam®, Cambridge, CB4 OFL UK).
- Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes Eugene, OR, USA).
- Tritón X-100 (0,2 %) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- STF 4% V/V.
- PBS.
- DAPI (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).
- Medio de montaje DABCO (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).

Estudio de la neogénesis

- Tampón Citrato (pH 6.0)
- Anticuerpo IgG monoclonal de conejo anti-PDX-1 (abcam[®] ab 47267)
- Anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado con sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Tritón X-100 (0,2 %) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- STF 4% V/V
- PBS.
- DAB (3-3'-diaminobencidina) (Sigma-Aldrich, MO, USA).
- Hematoxilina de Harris (Merk. Damstadt. Germany).
- Bicarbonato cálcico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Medio de montaje anhidro Entellan (Merk. Damstadt. Germany).

Estudio de la apoptosis

- Anticuerpo IgG monoclonal anti-Insulina de ratón (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 546 (Molecular Probes Eugene, OR, USA).
- TUNEL Apoptosis Detection System Fluorescein (Promega Corporation Madison, WI, USA).
- Tritón X-100 (0,2 %) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- STF 4% V/V.
- PBS.
- DAPI (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).
- Medio de montaje DABCO (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).

Determinación de la masa beta

- Anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado con sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Tritón X-100 (0,2 %) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- STF 4% V/V.
- PBS.
- DAB (Sigma-Aldrich, MO, USA).
- Hematoxilina de Harris (Merk. Damstadt. Germany).
- Bicarbonato cálcico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Medio de montaje anhidro Entellan (Merk. Damstadt. Germany).

Determinación de insulina. Técnica ELISA

- Ultrasensitive Rat Insulin ELISA[®] (Mercodia AB, Sylveiusgatan, Sweden).

B. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El estudio se ha llevado a cabo en ratas Wistar, machos sanos, con un peso aproximado de 250 gramos (g) y entre doce-catorce semanas de vida, suministradas por el Servicio de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz.

Todos los procedimientos con animales se han realizado de acuerdo a lo dispuesto en la normativa legal vigente y, en particular, con el Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Se han realizado con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz. La estabulación, realización de la cirugía, desarrollo de los protocolos y estudios se han llevado a cabo en el Animalario de la Universidad de Cádiz, en el Departamento de Anatomía y Embriología de la Facultad de Medicina de Cádiz y en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Puerta del Mar (Cádiz).

C. MÉTODOS

C.1. Grupos experimentales

Se han establecido cinco grupos experimentales y se han mantenido las mismas condiciones ambientales durante todo el estudio, tanto en el pre, intra y postoperatorio. Los grupos conformados son los siguientes (Figura 28):

1. Control de ayuno (CA): Grupo control no quirúrgico.
2. Cirugía Sham (S): Grupo control quirúrgico.
3. Cirugía con resección intestinal (RI50): Grupo quirúrgico malabsortivo.
4. Cirugía con bypass gástrico y montaje en Y de Roux (BG): Grupo quirúrgico mixto, restrictivo y malabsortivo.
5. Cirugía con gastrectomía vertical (GV): Grupo quirúrgico restrictivo.

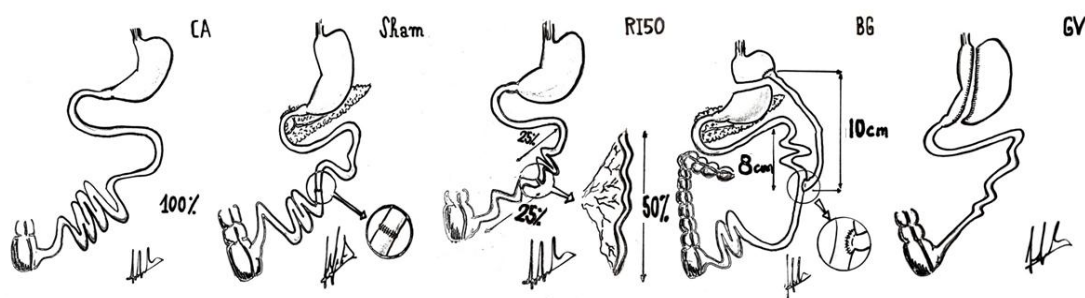


Figura 28. Dibujos esquemáticos de las diferentes cirugías realizadas en los distintos grupos. De izquierda a derecha: CA; no operado, S; control quirúrgico, RI50; grupo malabsortivo, BG; grupo restrictivo y malabsortivo (mixto), GV; grupo malabsortivo.

Todos los animales de los cinco grupos se han mantenido en un ambiente acorde a su ritmo circadiano habitual; sin estrés externo, reduciendo las manipulaciones al menor número posible de participantes y colaboradores; con dieta normal (pienso estándar suministrado por el SEPA) salvo en el caso del período preoperatorio en el cual fueron sometidas a doce horas de ayuno previo a la cirugía y en jaulas adecuadas para ello. Igualmente durante los tres días posteriores a la cirugía la dieta fue incrementándose pasando de líquida a la dieta estándar, mediante el uso de nutrición líquida hospitalaria (Resource® protein al 50 % para evitar la obstrucción de la boquilla de los bebederos) y así intentar evitar que se pudiesen producir problemas durante el tránsito de los alimentos por el tubo digestivo durante los primeros días.

El número de roedores que se ha determinado por grupo para el estudio han sido cuatro ($n=4$). La adscripción de cada animal al grupo de estudios fue al azar. Antes de determinar los procedimientos más oportunos, realizamos un periodo de training quirúrgico donde desarrollamos variaciones de las técnicas habituales, hasta determinar los niveles estándares que íbamos a aplicar en el estudio a todos los animales problema. Esto incluía las porciones y límites anatómicos que se iban a emplear en las técnicas quirúrgicas para todos los grupos estudiados. La mortalidad final de todos los animales operados fue menor al 5%. La supervivencia en todos los grupos se mantuvo durante doce semanas, después fueron sacrificados para posterior estudio de los páncreas.

A lo largo del período de supervivencia de los animales intervenidos se procedió a la realización de distintas pruebas funcionales. Se llevaron a cabo pruebas de sobrecarga intraperitoneales de glucosa, estudio de las glucemias e insulinemias a media mañana así como la realización del test de resistencia insulínica (HOMA-IR) (Figura 29).

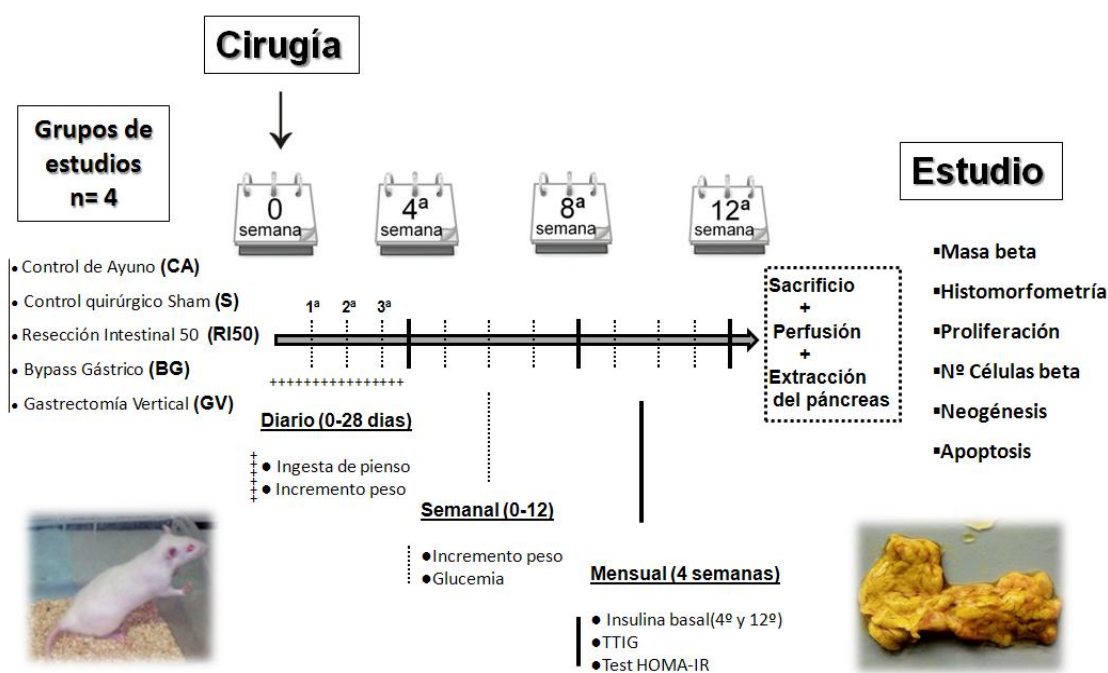


Figura 29. Secuencia esquemática temporal de la línea experimental. Descripción de cada uno de los pasos que la componen: la configuración de los grupos, tipos de cirugía, pruebas funcionales y estudio del páncreas realizado.

C.2. Técnicas quirúrgicas

La cirugía en las ratas fue llevada a cabo una vez anestesiadas con gas (isoflurano). La inducción se realizó impregnando una gasa con el anestésico, tras introducir a la rata en una caja cerrada. Este paso se realizó bajo campana para evitar la

aspiración por parte de los cirujanos. El mantenimiento anestésico se consiguió mediante bomba de ventilación continua de isoflurano (entre 1-3%, dependiendo del tiempo requerido de cirugía, evitando que el animal entrase en parada respiratoria). Se administraba a través de una mascarilla que incluía el hocico y la boca, conectada a la bomba de ventilación.

Como medida adicional en aquellos procesos quirúrgicos de mayor tiempo de duración, se mantuvo una fuente de calor bajo el animal durante el mismo, a fin de que no entrara la rata en hipotermia por la apertura de la cavidad abdominal. En definitiva, se trataron de reproducir las condiciones externas más similares a usos habituales en cirugía, a fin de reducir la mortalidad operatoria y eliminar los sesgos que pudieran interferir en la interpretación de los datos.

C.2.1. Control de ayuno (CA). Grupo control no quirúrgico

Este grupo de ratas no fue operado, conformando uno de los dos grupos control del estudio. Todas las actuaciones en este grupo son exactamente iguales al resto, tanto en el manejo perioperatorio como postoperatorio inmediato, tardío y el seguimiento hasta su sacrificio. Este grupo se comporta como el patrón estándar frente al cual referenciar cualquier dato observado, ya que no recibieron tratamiento quirúrgico alguno, pero el resto de parámetros fueron idénticos al grupo control quirúrgico y los grupos quirúrgicos problemas.

C.2.2. Sham (S). Grupo control quirúrgico

La cirugía se realizó previa colocación de la rata en decúbito supino, sin necesidad de sujeción del mismo. A la piel del abdomen se le aplicó solución antiséptica (clorhexidina tópica); sin rasurado se llevó a cabo una pequeña laparotomía media de unos 2-3 cm en el tercio medio de la línea media abdominal. A continuación se procedió a la evisceración de todas las asas de intestino delgado de manera anatómica en forma de abanico cuidadosamente mediante pinzas atraumáticas. En el paso siguiente se midió en centímetros (cm) el intestino delgado comprendido entre el ángulo de Treitz hasta la válvula ileo-cecal mediante cinta métrica adecuada.

A los ejemplares del grupo S, al tratarse del control quirúrgico, se les realizó una sección transversal completa del intestino delgado, sin resección del mismo. Se realizó aproximadamente en la mitad del trayecto del intestino delgado que interesa a yeyuno e íleon. La anastomosis de las asas se hizo termino-terminal mediante sutura con puntos sueltos de material de 0000 (Vicryl® 4/0).

Por último se suministraron 15 cc de suero fisiológico a temperatura corporal dentro de la cavidad. Las asas de intestino se reintrodujeron en la cavidad abdominal. El cierre de la pared abdominal fue en un solo plano incluyendo piel con sutura continua de 000 (Vicryl® 3/0) (Figura 30).

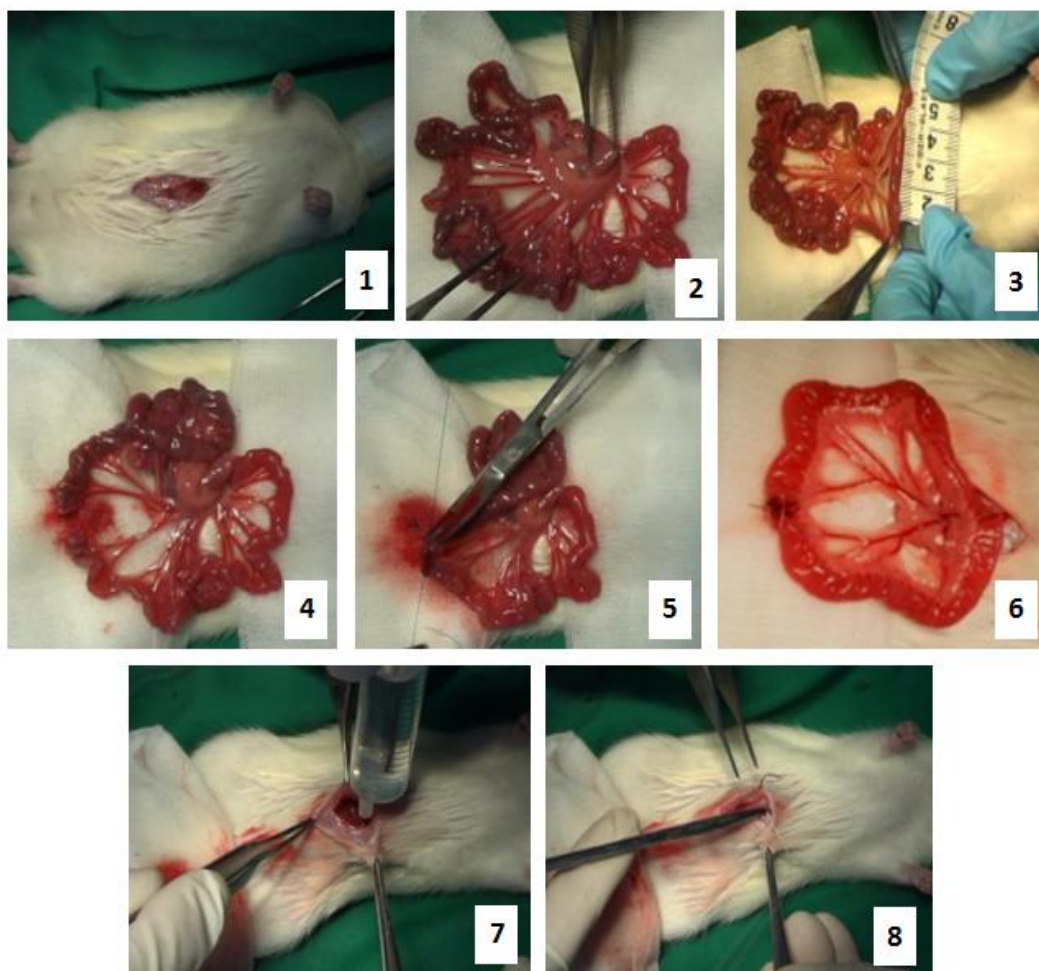


Figura 30. Secuencia de los pasos durante la cirugía de las ratas pertenecientes al grupo control quirúrgico (S). 1. Rata anestesiada con la mascarilla e incisión abdominal en línea media. 2. Visualización, previa evisceración, de todo el paquete de intestino delgado para elegir la zona de sección. 3. Medición de todo el intestino delgado 4. Enterotomía transversal, sin resección intestinal. 5. Enterorrafia con puntos sueltos. 6. Resultado final de la anastomosis. 7. Instilación de suero salino fisiológico a 37 °C en cavidad abdominal. 8. Cierre de la pared abdominal.

C.2.3. Resección intestinal masiva (RI50). Grupo quirúrgico malabsortivo

La cirugía en el grupo RI50 es perfectamente equiparable a los pasos objetivados en el grupo S, la única y principal diferencia radica en la resección de parte del intestino delgado. Se resecó al menos el 50 % de intestino delgado. La medición de la longitud del intestino fue como en la técnica previa. Se preservó el 25 % del intestino delgado distal al

ángulo de Treitz y el 25 % proximal a la válvula ileo-cecal. Posterior a la medición se procedió a la enterotomía transversal en las regiones anatómicas referidas. El mesenterio junto a la arcada vascular que nutre el segmento de intestino resecaado se extirpó previa ligadura con sutura de 000 (Vicryl® 3/0). Para evitar hernias internas se procedió al cierre de la brecha mesentérica con sutura de 0000 (Vicryl® 4/0). La secuencia restante es igual al grupo S, incluyendo la hidratación intraperitoneal con suero a temperatura corporal (Figura 31)

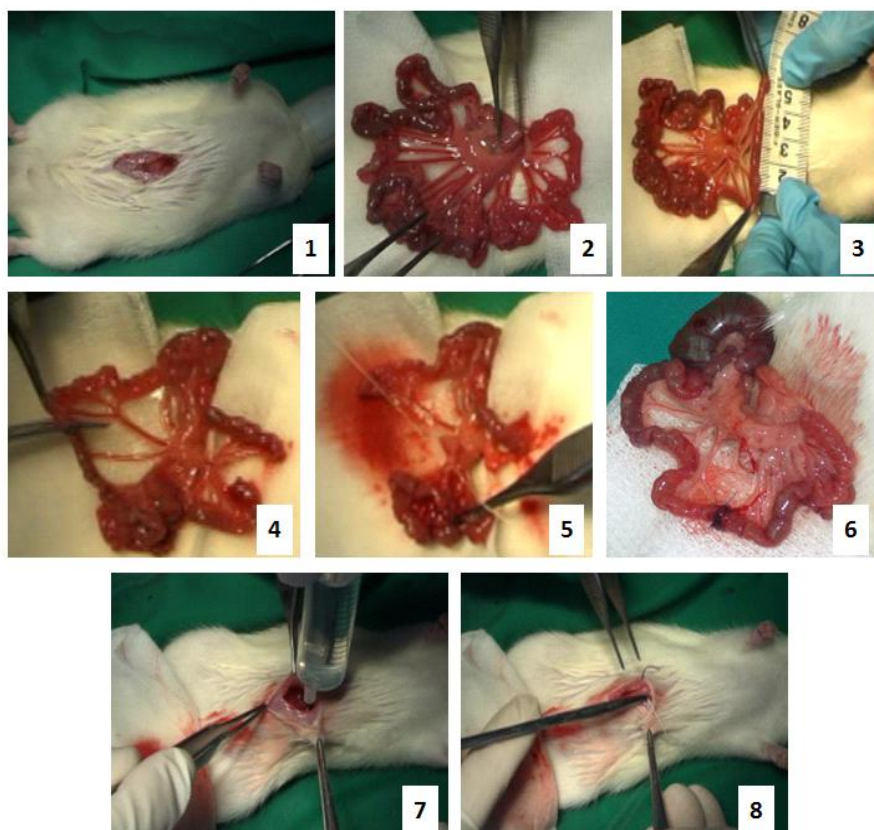


Figura 31. Intervención realizada a las ratas pertenecientes al grupo RI50. 1. Laparotomía media de unos 3 cm. 2. Exposición de las asas de delgado. 3. Cuantificación de la longitud en centímetros del intestino delgado 4. Enterotomía transversal proximal (ya realizada) y distal (la que se observa en la foto) para extirpar la zona media del intestino delgado. 5. Ligadura del mesenterio con ligadura única. 6. Resultado final de la anastomosis, obsérvese el ojal mesentérico que queda tras la exéresis del intestino. 7. Instilación de suero salino fisiológico a 37 °C en cavidad abdominal. 8. Cierre de la pared abdominal.

C.2.4. Bypass gástrico con montaje en Y de Roux (BG): Grupo quirúrgico mixto (restrictivo y malabsortivo)

La técnica se llevó a cabo mediante una laparotomía media de unos 5 cm en tercio medio-superior, con posterior evisceración del estómago para una correcta exposición del mismo y de las asas intestinales. La sección transversal con tijera del estómago se realizó, previa aplicación de clamps atraumáticos, entre la región polar superior del estómago (llamado *forestomach*, rumen ó panza) con el resto del estómago. Macroscópicamente ambas regiones anatómicas en la rata se diferencian sin dificultad de visu; el rumen posee una tonalidad más clara que el resto del estómago. La zona de sección del cuerpo gástrico se cerró mediante sutura continua con monofilamento 0000 (Prolene® 4/0). La gastrorrafia del rumen-fundus gástrico se realizó igualmente mediante sutura continua con (Prolene® 4/0) desde la curvatura menor a la mayor, dejando sin suturar los últimos 0.5-0.7 cm del estómago para así, de esta manera, restablecer la continuidad del tubo digestivo con un asa de yeyuno (asa alimentaria). La sección del estómago no era completa; preferíamos mantener intacto el borde gástrico de la curvatura menor, preservando así los filetes del nervio vago que discurren a este nivel. Este pequeño segmento no cortado, aunque si suturado, no permite comunicación entre ambas neo-cámaras formadas, la del rumen y la de la región gástrica propiamente dicha. Antes de proceder al siguiente paso se llevaba a cabo la comprobación de la permeabilidad del estómago hacia el esófago con un pinza curva.

El siguiente paso se realizó en el intestino delgado, con sección transversa del yeyuno a unos 10 cm distal al ángulo de Treitz. El extremo distal del yeyuno se anastomosó al remanente del gástrico superior (rumen) con puntos sueltos de Prolene® 4/0. Nos aseguramos de que la sutura fuera estanca y no existieran comunicaciones del rumen con la cavidad peritoneal.

El último paso para completar la continuidad del tubo digestivo fue realizar la anastomosis entre el asa alimentaria (gastro-yeyunal) de unos 10 cm de longitud con el segmento de asa yeyunal proximal (asa no-alimentaria ó biliopancreática) a través de la que se produce la llegada de las secreciones biliopancreáticas. El llamado pie de asa quedó configurada mediante una anastomosis termino-lateral con puntos sueltos (Prolene® 4/0). A este pie de asa confluyen las secreciones del asa biliopancreática y de la alimentaria para continuar su recorrido ordinario a través del tubo digestivo. Al igual que en la cirugía del grupo RI50, se cerró la brecha mesentérica. Se administró suero isotónico intraabdominal (15cc). El cierre de la pared abdominal, como en sus grupos precedentes, fue llevada a cabo con sutura continua monobloque 000 (Vicryl® 3/0) (Figura 32).

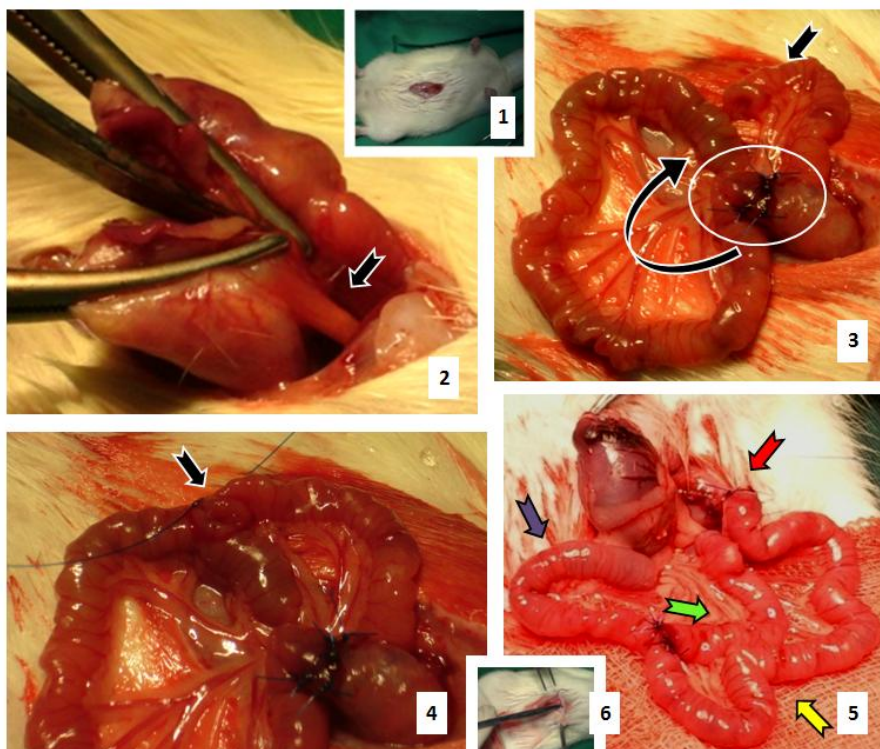


Figura 32. Pasos claves de la cirugía BG. 1. Incisión de la piel y pared abdominal hasta abdomen. 2. Sección del estómago a nivel de rumen- cuerpo gástrico entre clamps. La flecha muestra el esófago con permeabilidad para el paso de alimentos. 3. Conformación de la anastomosis gastroyeyunal (círculo), que se continúa con el asa alimentaria (10cm) (flecha curva) para posteriormente anastomosarse con el asa biliopancreática (flecha). 4. Confección de la anastomosis yeyuno-yeyunal, también conocida como pie de asa (flecha). 5. Cirugía finalizada. Flecha roja; anastomosis gastroyeyunal. Flecha amarilla; asa yeyunal (alimentaria). Flecha lila; asa biliopancreática. Flecha verde: Asa común. 6. Cierre de la pared, previa hidratación intraperitoneal.

C.2.5. Cirugía con gastrectomía vertical (GV): Grupo quirúrgico restrictivo

Una vez anestesiada, se procedió a la realización en primer lugar a una laparotomía media de unos 4-5 cm en el tercio superior de la línea media del abdomen llegando la incisión a la apófisis xifoides debido a la localización subfrénica del estómago.

Para la realización del tubular gástrico fue necesario en primer lugar la gastrolisis mediante la liberación parcial con pinzas del omento menor y la sección entre ligaduras (Vicryl® 4/0), del ligamento gastroesplénico (que incluía los vasos cortos).

El tubular gástrico que se obtiene posee unos 0.5/0.7 cm de diámetro; para resecar la curvatura mayor se aplicó una pinza curva atraumática que englobaba todo el estómago desde el ángulo de Hiss hasta el antro. Con este paso se consigue una luz cilíndrica gástrica a través de la cual discurrirá el bolo desde el esófago al duodeno.

Se preservaron tanto el píloro como la unión esófago-gástrica y se resecó la mayoría del rumen, fundus, parte del cuerpo-curvatura mayor y parte del antro. El omenton mayor también es resecado junto a la pieza. La gastrorrafia para conseguir la estanqueidad del tubular gástrico fue llevada a cabo con hilo del 0000 (Prolene[®] 4/0). Como en el resto de las técnicas se completa la cirugía mediante hidratación peritoneal con 15 cc de suero fisiológico a 37°C. Se cerró la pared abdominal en bloque con sutura continua 000 (Vicryl[®] 3/0) (Figura 33).

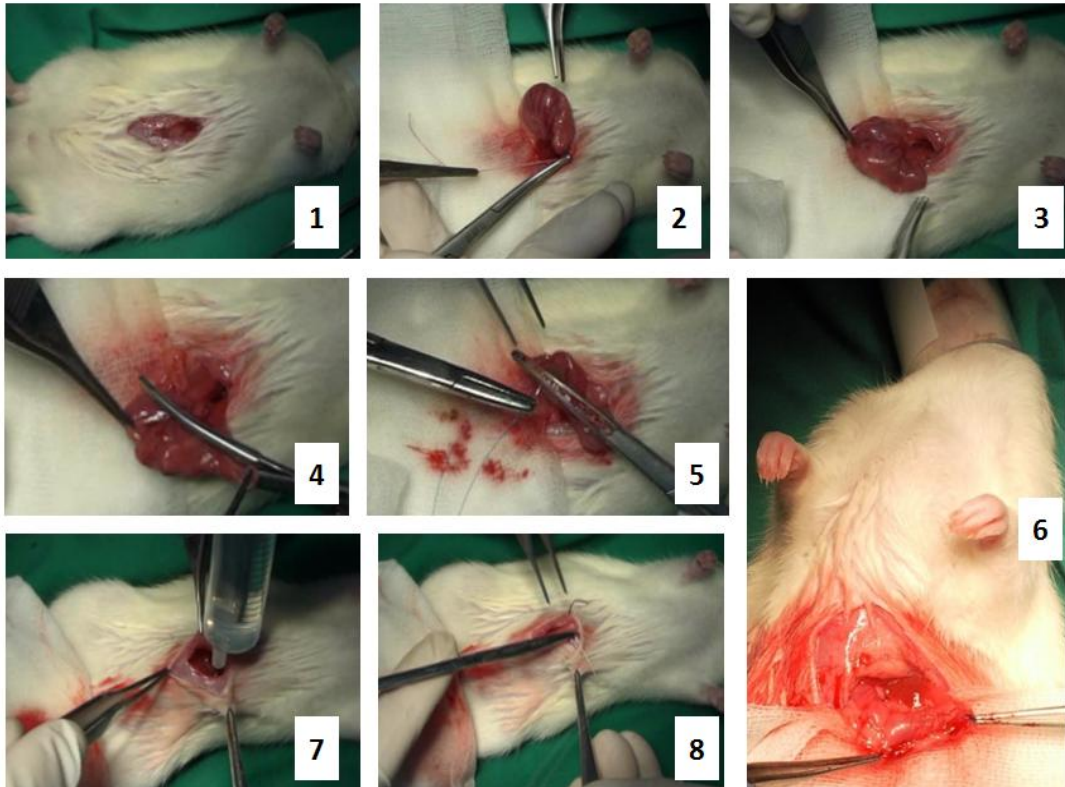


Figura 33. Gastrectomía Vertical. 1. Laparotomía media en tercio superior. 2. Liberación del estómago, previa sección y ligadura del ligamento gastroesplénico. 3. Exposición del estómago. Véase como es posible extraerlo completamente de la cavidad abdominal tras la adhesiolisis. 4. Aplicación de clamp curvo para la gastrectomía vertical y conformar el tubular gástrico. 5. Gastrorrafia con sutura continua. 6. Resultado tras la cirugía en el estómago. 7-8. Cierre monobloque abdominal de la pared, previa hidratación.

C.3. Determinaciones funcionales

C.3.1. Ingesta e incremento de peso

El control de la ingesta y del peso ha sido diario durante las primeras cuatro semanas tras la cirugía. Para llevar a cabo la medida de la ingesta diaria que hacía el animal, el pienso que se le suministraba en la jaula era pesado previamente en una báscula; al día siguiente se cuantifica el pienso remanente, obteniéndose por tanto la ingesta diaria.

Para cuantificar el peso del animal y conocer, de ésta forma, el incremento ponderal de peso, se ha utilizado una báscula y una jaula vacía. Se tara la jaula antes de la pesada de cada animal. Posteriormente a estas cuatro semanas, la cuantificación del peso fue semanal durante las siguientes siete semanas, cubriendo un seguimiento total de once semanas. Ambos parámetros se midieron en gramos (g).

C.3.2. Determinación de la glucemia

Se realizaron cuantificaciones semanales. Las glucemias se realizaron en la misma franja horaria, a primera hora de la mañana. La medición se hizo mediante un glucómetro (Accucheck optimun[®]) y tiras reactivas calibradas específicas. La sangre, alrededor de unos 2 µl, se obtuvo de la cola del animal mediante punción de la misma con lanceta estéril. Los resultados se expresan en mg/dl.

C.3.3. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

El test de tolerancia intraperitoneal de glucosa (TTIPG) se realizó después de 16-18 horas de ayuno del animal. Se procedió a cuantificar la glucemia mediante glucómetro (Accucheck optimun[®]) a partir de la sangre obtenida mediante punción en la cola (2 µl). Tras ésta determinación basal de glucosa, se inyectó a nivel intraperitoneal una solución conteniendo 2 gr de glucosa por kilogramo de peso del animal. Se realizaron nuevas determinaciones de glucemias a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras la administración de la misma. Los resultados obtenidos se muestran en una curva temporal expresándose en miligramos/decilitro (mg/dl) de glucosa en sangre. El número de TTIPG que se estimaron necesario en el estudio fueron tres, a las cuatro, ocho y doce semanas; este test supone un importante desajuste brusco del metabolismo hidrocarbonado. Para ser tenidos en cuenta sus valores como válidos ha de encontrarse el animal en una situación basal no estresada.

C.3.4. Determinación de la insulinemia basal

Para la determinación de la insulinemia basal en los animales a estudio se utilizó una muestra de suero de 20-30 µl, previa extracción de sangre de la cola con tubo capilar tras pequeña sección de la cola. Estos se centrifugaron durante 7 minutos (min) a 14000 rpm y dos grados de temperatura. Posteriormente se separó el plasma del sobrenadante con micropipeta conservándose a -20°C hasta su procesamiento. A las ratas se les retiró el pienso para que hicieran un período de ayuno de 16-18 horas y así asegurarnos valores basales.

La cuantificación de los niveles de insulina en sangre se llevó a cabo mediante la técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent assay* (ELISA) utilizando el kit comercial *Ultrasensitive Rat Insulin ELISA* (Mercodia AB, Sylveiusgatan, Sweden) a partir de alícuotas de 10 µl de suero procedente de muestras de sangre extraídas por punción de la cola del animal. Se utilizó como soporte una placa de 96 pocillos incubados con una solución con anticuerpos anti insulina a 1-10 µg/ml, posteriormente se lavó con PBS y bloqueó con una solución de BSA al 5% V/V. Las muestras y controles (blanco y curvas estándar) diluidas fueron incubadas en cada uno de los pocillos 90 min a 37°C, lavadas con PBS e incubadas 120 min a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HPRL) según las instrucciones del fabricante. Nuevamente lavado con PBS y por último se incubó con el sustrato cromógeno pNPP a temperatura ambiente durante 15 min y fue examinado en un lector de elisas automático a 405 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como microunidades internacionales por mililitro µUI/ml.

Esta determinación se realizó a las cuatro y doce semanas en cada uno de los animales a estudio.

C.3.5. Índice de resistencia insulínica

El índice de resistencia insulínica/HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance) se ha obtenido según la fórmula de Matthews:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucosa (mg/dl)} \times \text{Insulina basal (}\mu\text{UI/ml)}}{405}$$

Los resultados obtenidos se expresaron en mgr/dl¹ µUI/ml. La obtención así como el registro de la glucosa y la insulina se han definido en los puntos C.3.2. y C.3.4.

C.4. Sacrificio y preparación de las muestras

Doce semanas después de las intervenciones quirúrgicas todos los animales fueron sacrificados. Previo al mismo, para su sedación, y en consonancia con la normativa vigente (Real Decreto 1201/2005, sobre Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos), se utilizó hidrato de cloral intraperitoneal a dosis letal (3,5 ml). Se administró en bolo intraperitoneal único y se establecieron unos minutos para la inducción del fármaco objetivando el estado de inconsciencia del animal.

A continuación se procedió a una laparotomía en cruz abdominal asociando una toracotomía paraesternal derecha e izquierda con exposición generosa del mediastino y el corazón. Para evitar la coagulación precoz del compartimento intravascular se inyectó 3 UI de heparina en el ventrículo izquierdo. Posteriormente, y continuando en ritmo sinusal, se introdujo en el ventrículo izquierdo un catéter de 14 French hasta la aorta ascendente. Se perfundió a través de este circuito unos 200 ml de Líquido de Bouin. El líquido de Bouin es un fijador clásico que consta en 75% de una solución de ácido pícrico en agua (saturado al 1%) y paraformaldehído (37% Peso/Volumen (P/V)) para prefijar los tejidos que posteriormente se extraerán; antes se perfundieron unos 100 ml de PBS para eliminar toda la sangre completa que se pueda del circuito arteriovenoso. Todo este proceso se llevó a cabo con una bomba de perfusión, en ciclos de presión fisiológica y pulsátil de forma que no sufriesen los tejidos.

Tras la perfusión y su prefijación, se procedió a la extracción de los páncreas en bloque, limpiándolos de restos de tejido conectivo, grasa, ganglios y adherencias varias. Antes de dicha extracción se objetivó la ausencia de repermeabilización de rumen con el resto del estómago en el caso del BG, al igual que se observó la ausencia de anomalías en el pie de asa (estenosis, fistulas, dilataciones retrógradas). Tampoco se visualizaron alteraciones de esta índole en las ratas del resto de los grupos (S, RI50 y GV). Los páncreas fueron secados y pesados en una báscula de precisión. La fijación posterior se realizó sumergiéndolos overnight en solución de Bouin a 4°C, tras lo cual, se introdujeron en formalina (paraformaldehído al 37% P/V a 4°C) durante otras veinticuatro horas con objeto de asegurar el proceso de fijación de los mismos.

Las muestras fijadas se deshidrataron en solución de alcoholes crecientes de 70° hasta absoluto y Xilol. El último paso para su conservación fue incluirlas en parafina de punto de fusión media (57°), para ser después cortadas en microtomo en secciones de 10µm. Los bloques de parafina obtenidos se ordenaron, etiquetaron y clasificaron asignándoles un número correlativo, sin poder conocer inicialmente, a qué tipo de cirugía habían

pertenecido. Eliminamos el sesgo de observador durante el proceso posterior de las muestras, hasta el momento en que se asignaban los datos obtenidos a los grupos de animales propuestos.

C.5. Determinaciones tras el sacrificio

C.5.1. Estudio del número de células beta en el islote pancreático

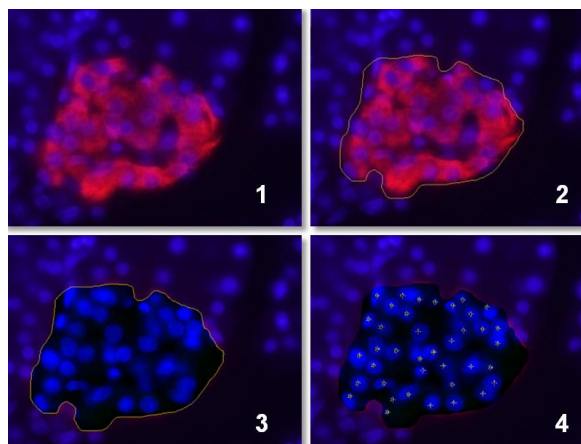
En cortes de tejido pancreático obtenidos de la manera anteriormente descrita se analizó la existencia de fenómenos de hiperplasia en la masa de células beta pancreática de cada uno de los grupos. Se procedió a su rehidratación en una secuencia de pasos progresivos de 5 min en xilol, alcohol absoluto y decrecientes de 96° a 70°. A continuación se facilitó la permeabilidad de las membranas celulares de las muestras en un baño con una solución de Tritón X-100 al 0,02% P/V a temperatura ambiente durante 30 min.

Las muestras hidratadas y permeabilizadas fueron incubadas con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) *overnight* a 4°C según instrucciones del proveedor. El revelado se obtuvo con el anticuerpo anti-IgG de ratón anti-insulina conjugado con un fluoróforo (Alexa 546 (rojo) / Cy3) (Molecular Probes Eugene, OR, USA) incubándose durante una hora (h) a temperatura ambiente. Por último, los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6'Diamino fenil indol (DAPI) en medio de montaje DABCO (1:1000 Volumen/Volumen (V/V)).

Realizados los pasos descritos se procedió a realizar el recuento del número de núcleos rodeados de citoplasma insulina positivo y el área total insulina positiva en 40 islotes para cada grupo de estudio con ayuda de un microscopio óptico (40x) y una cámara digital Olympus DP71 acoplada que asociaba un escáner de imágenes Nikon Supercoolscan con el software para tratamiento de imágenes (Image J®). Los datos obtenidos se expresaron como: Número de núcleos con citoplasma insulina positivo / Área insulina positiva total en mm² (Figura 34).

Figura 34. Imágenes representativas de los pasos para la medición del número de núcleos por islote pancreático.

1. Fotografía del islote
2. Marcaje periférico para determinar el área del islote
3. Sustracción del marcaje insulina positivo
4. Contaje de núcleos.



C.5.2. Estudio de la proliferación en el islote pancreático

La determinación de la aparición de nuevas células beta a partir de otras células beta ya existentes en los animales a estudio se analizó atendiendo a la presencia del marcador de proliferación ki67 en los islotes. Este se identificó mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Se obtuvieron cortes de 10µm de grosor en cada páncreas de cada grupo. Se rehidrataron en xilol y alcoholes decrecientes de 100° a 70°. Al igual que en los casos anteriores se permeabilizaron por inmersión en solución de Tritón X-100 al 0,02% P/V durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico con calor, mediante inmersión en solución de tampón citrato pH 6.0 durante 7 min, en tres tandas con 5 min de reposo entre las misma, en horno microondas a 800 watios.

Tras enfriar y lavar las muestras se procedió a su tinción con un anticuerpo IgG monoclonal anti-Ki67 de conejo (Abcam®, Cambridge, CB4 OFL UK) incubado durante 12 h a 4°C. Posteriormente, se reveló durante 1 h con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488 (Molecular probes®/labelling-detection USA).

La contratinción de las células beta se realizó con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), incubado 12 h a 4°C, según instrucciones del proveedor. El revelado se hizo con otro anticuerpo anti-IgG de ratón anti-insulina conjugado con un fluoróforo Alexa 546 (rojo) / Cy3) (Molecular Probes Eugene, OR, USA) incubado 1 h a temperatura ambiente. Por último los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6'Diamino fenil indol (DAPI) diluido 1:1000 V/V en medio de montaje DABCO.

Las muestras obtenidas tras este procedimiento se examinaron con un microscopio de fluorescencia (40x) y una cámara digital Olympus DP71 acoplada con el software para tratamiento de imágenes Cell-D® estudiándose un mínimo de 40 islotes elegidos aleatoriamente en cada grupo de estudio. Los resultados se expresaron como: Número de células Ki67 positiva - insulina positiva /Área insulina positiva en mm² (Figura 35).

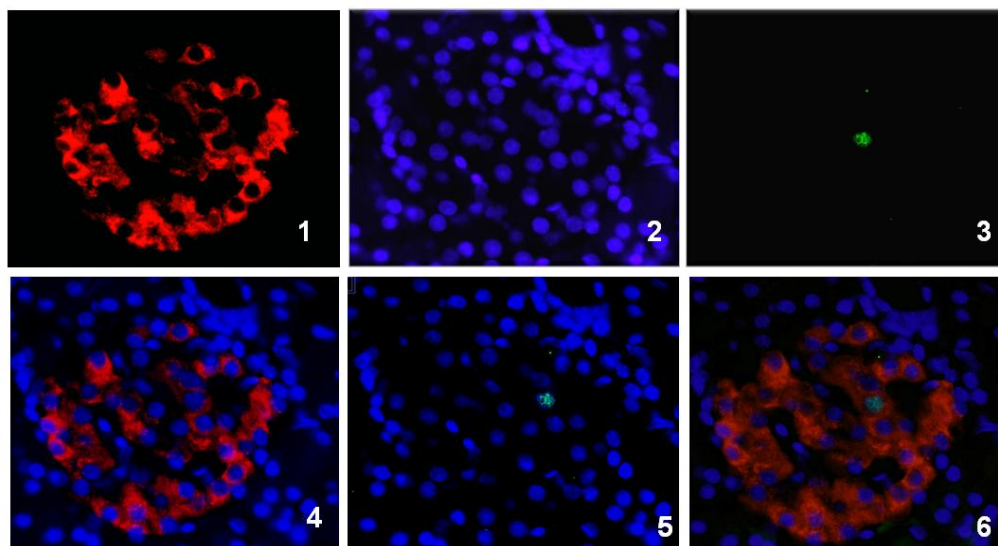


Figura 35. Imágenes representativas de los pasos para definir células Ki67 positiva-insulina positiva/Área insulina positiva. 1, 2 y 3. Localización de islote (insulina positiva), núcleos (DAPI positivo) y núcleo en proliferación (Ki 67 positivo). 4, 5 y 6. Superposición de imágenes en Cell D® comprobando que la célula Ki67 se encuentra en el núcleo-DAPI positivo y dentro del islote (insulina positiva).

C.5.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas

Para determinar la presencia de células beta originadas a partir de otras stem cells o células ductales (neogénesis) hemos analizado la presencia del factor de transcripción PDX-1 asociado al desarrollo de linajes celulares encaminados a la formación de células beta de “novo” en los páncreas objeto de estudio.

De esta manera hemos obtenido secciones de 10µm de grosor realizadas con un microtomo a cada uno de los grupos. Al igual que en los estudios previos los portas fueron rehidratados en xilol y alcoholes absolutos y decrecientes de 96° a 70°. Para a continuación permeabilizar los tejidos con un baño en una solución de Tritón X-100 al 0,02% P/V, a temperatura ambiente durante 30 min. El proceso de desenmascaramiento antigénico se consiguió con calor mediante inmersión en solución de tampón citrato pH 6.0 durante 7 min en el horno microondas a máxima potencia (800 watos), con intervalos de 5 min de reposo entre cada tanda de 7 min.

Tras enfriar 15 min y lavar las muestras se procedió a su tinción con un anticuerpo IgG monoclonal anti-PDX-1 de conejo (Abcam® ab 47267) incubado durante 12 h a 4°C. Posteriormente se incubó durante 1h con un anticuerpo secundario conjugado con biotina anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), para después amplificar la señal con el complejo de Biotina–Estreptavidina– Peroxidasa. El revelado se realizó con una

solución de DAB, (0,3 mg/ml of 3,3'Diaminobencidina. Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en presencia de 0,2 µl/ml of H₂O₂ bajo control microscópico. Finalmente se realizó una contratinción de las mismas mediante inmersión en solución de hematoxilina de Harris durante 10 segundos a temperatura ambiente. Se montaron en medio Entellan con base de xilol.

Las muestras obtenidas se analizaron gracias a un microscopio óptico (40x) y una cámara digital Olympus DP71 acoplada con el software para tratamiento de imágenes Cell-D®. Se examinaron en esta ocasión *de visu* 12 campos al azar en cada una de las muestras, determinándose la existencia o no de células PDX-1 positivas en cada uno de ellos (Figura 36).

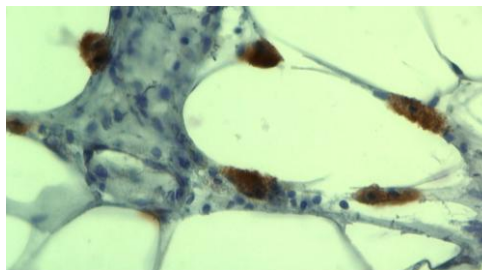


Figura 36. Imagen de una de las muestras de tejido (x40) donde podemos apreciar la presencia de inmunomarcaje del factor de transcripción PDX-1. Contratinción nuclear con hematoxilina.

C.5.4. Estudio de la apoptosis en las células beta

Se utilizaron de nuevo para este propósito cortes de páncreas de cada grupo idénticos a los utilizados en otras técnicas inmunohistoquímicas anteriores y se llevó a cabo también el mismo proceso de rehidratación en xilol y alcoholes absolutos decrecientes. Se facilitó la permeabilidad de la membrana con el mismo procedimiento de inmersión en Tritón X-100 al 0,02% P/V a temperatura ambiente durante 30 min.

La detección de células apoptóticas se realizó mediante la técnica TUNEL ("Terminal deoxynucleotidyl Trasferase (TdT)-mediated-dUTP nick end labelling) basada en la unión de nucleótidos conjugados con un fluoróforo. En este caso a los extremos libres de las cadenas de ADN presentes en las células apoptóticas por la enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil Transferasa) en un medio rico en Magnesio.

Los procedimientos para la realización de la técnica se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante del kit empleado (Promega Corporation Madison, WI, USA). En primer lugar se aplicó el buffer de equilibrio durante 10 min a 37°C, siendo previamente necesario que la superficie sobre la que se iban a apoyar los portas (papel secante) estuviese húmedo y precalentado. A continuación, tras retirar el buffer, se aplicó el TdT con nucleótidos en una nueva solución buffer según las proporciones del fabricante. Se mantuvo en estufa a 37 °C durante 45 min. Por último y para frenar la reacción previa, se aplicó un solución hiperosmolar al 10% (SCC) con agua durante 20 min a temperatura ambiente. A

partir de este último paso, los restantes se realizaron en oscuridad para preservar la inmunofluorescencia conseguida.

La contratinción de las células beta se realizó con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina incubado 12 h a 4°C overnight. Posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con un fluoróforo Cy3 (Molecular Probes Eugene, OR, USA), 1 h a temperatura ambiente. Para terminar, los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6'Diamino fenil indol (DAPI) diluido 1:1000 V/V en medio de montaje DABCO.

El análisis de las muestras se realizó nuevamente empleando un microscopio de fluorescencia (40x) y una cámara digital Olympus DP71 acoplada con el software para tratamiento de imágenes Cell-D®. En el diseño del experimento se determinó analizar un mínimo de 50 islotes al azar en cada una de las muestras y expresar el resultado como: $\text{Número de células TUNEL positivo} - \text{insulina positiva} / \text{Área insulina positiva en mm}^2$ (Figura 37).

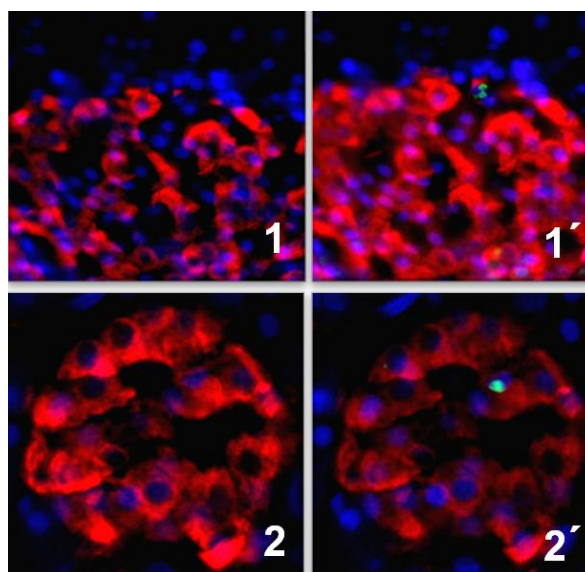


Figura 37. La cuantificación de la apoptosis se realiza de igual manera que la proliferación. Se localiza el islote pancreático (Insulina positivo /rojo), a continuación se aplica el filtro para localizar el inmunofluoróforo verde, corroborando que existe (positivo /verde) y que este además se encuentra dentro del islote pancreático. Para objetivar que la célula apoptótica se localiza en el núcleo insulina positivo, este se marca con DAPI (azul). Posteriormente las tres imágenes guardadas se montan y se superponen en el programa Cell-D®. Se muestra las fotos 1 (x20) y 2 (x40) con insulina y DAPI positivo. La 1' (x20) y 2' (x40) el mismo islote con TUNEL positivo. El área del islote se mide igual que para el estudio de la hiperplasia.

C.5.5. Estudio de la masa beta pancreática

El páncreas de cada rata se procesó con microtomo para obtener dos cortes de 10µm de grosor espaciados al menos 100µm cada corte. El páncreas se encontraba extendido consiguiéndose en cada porta toda la superficie del mismo. Se procedió a su rehidratación en una secuencia de pasos progresivos de 5 min en xilol y alcoholes decrecientes de 100° a 70°. A continuación se facilita la permeabilidad de las membranas celulares de las muestras en un baño con una solución de Tritón X-100 al 0,02% P/V a temperatura ambiente durante 30 min.

Las muestras hidratadas y permeabilizadas fueron incubadas 12 h a 4°C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) según instrucciones del proveedor. Se incubaron con un anticuerpo secundario biotinizado anti-IgG de ratón y posteriormente incubado con el complejo de amplificación Estreptavidina-Peroxidasa. El revelado se realizó con una solución de DAB, (0,3 mg/ml de 3,3 Diaminobencidina) en presencia de 0,2 µl/ml de H₂O₂ bajo control microscópico.

Por último se realizó una contratinción de las mismas mediante inmersión en solución de hematoxilina de Harris durante 10 segundos a temperatura ambiente y se montaron con medio de montaje Entellan con base de xilol.

Estas muestras se estudiaron con ayuda de un microscopio óptico con una cámara digital Olympus DP71 acoplada. A continuación con el escáner de imágenes Nikon Supercoolscan® las imágenes de los portas fueron guardadas. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el software del programa Image J® (Figura 38).

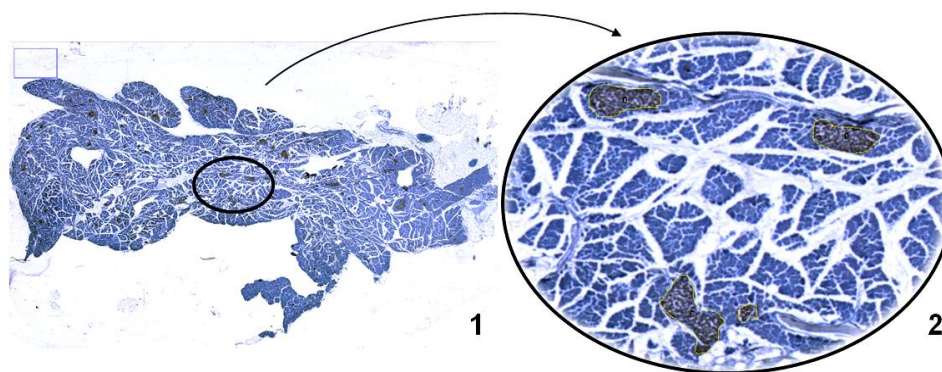


Figura 38. Metodología para el cálculo de la masa beta. 1. La exposición del porta completo con el páncreas a estudio permite medir el área total del mismo (x10). 2. La medición de los islotes pancreáticos es posible tras su aumento (x40). Se observa el color marrón, típico del revelado con DAB. Las imágenes fueron analizadas con el software del programa Image J®.

De esta manera se valoraron en cada muestra el ratio: Área insulina positiva/Área total del páncreas. El valor resultante se multiplicó por el peso de cada uno de los páncreas estudiados. La masa celular beta se ha expresado en mg.

C.6. Estudio estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos con las técnicas mencionadas fueron analizados utilizando el test no paramétrico “U” Mann-Whitney para el estudio de diferentes parejas. Los datos se ha expresado como la media \pm error estándar de la media (EEM) de los valores obtenidos. Todos los valores con p menor de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Según la hipótesis y los objetivos planteados, los experimentos se plantearon al objeto de estudiar los posibles efectos sobre las modificaciones funcionales durante el período de seguimiento, así como la histomorfometría del páncreas y su masa beta. Otro apartado esencial ha sido el análisis del comportamiento biológico de las célula beta pancreática (número de células, proliferación, neogénesis y apoptosis). Los resultados se han desglosado en los siguientes epígrafes.

1. Resultados de la ingesta e incremento de peso
2. Resultados de las pruebas funcionales
 - 2.1. Glucemia
 - 2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa
 - 2.3. Insulinemia basal
 - 2.4. Test de resistencia insulínica
3. Resultados inmunohistoquímicos de la célula beta pancreática
 - 3.1. Número de células
 - 3.2. Proliferación
 - 3.3. Neogénesis
 - 3.4. Apoptosis
4. Resultados del estudio de la histomorfometría y la masa beta
 - 4.1. Histomorfometría
 - 4.2. Masa beta

Los resultados obtenidos se han agrupado para una mejor comprensión. En primer lugar, para cada parámetro de los señalados más arriba, hemos agrupado cada técnica de CB comparándola con los dos grupos controles, el control de ayuno y el control quirúrgico (CA y S). Posteriormente se han comparado los tres grupos quirúrgicos entre ellos. Por último, todos los resultados se han agrupado en tablas y gráficas para poder comparar las técnicas bariátricas y obtener una visión global de los fenómenos que han acontecido.

A. GRUPOS TRAS CIRUGÍA CON RESECCIÓN INTESTINAL DEL 50% VS. GRUPOS CONTROLES

A.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso

En relación a la ingesta, esta se ha mostrado ligeramente inferior en el grupo RI50 durante las cuatro semanas comparándolo con los grupos controles. Estos se solapaban en varios puntos temporales. No obstante no se han apreciado diferencias significativas al final de este período entre los tres grupos (Figura 39). Los primeros cinco días tras la cirugía todas las ratas de los distintos grupos estuvieron sometidas a nutrición líquida tras el ayuno postoperatorio y agua *ad libitum*. Es por esto que no queda reflejado en la gráfica.

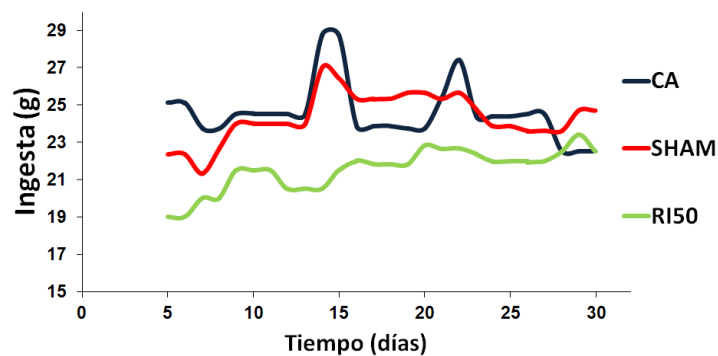


Figura 39. Muestra la ingesta en gramos (g) (eje Y) frente a tiempo en días (eje X) durante el primer mes.

El incremento ponderal de peso del grupo S se equipara al CA a partir de la 2-3 semana. Tanto el grupo S como el grupo RI50 se ven afectados en las primeras semanas por la cirugía. Por otro lado el grupo RI50, se muestra en todo momento con incremento inferior a los controles, siendo estadísticamente significativas las diferencias a las 11 semanas (≤ 0.05) (*) (Figura 40).

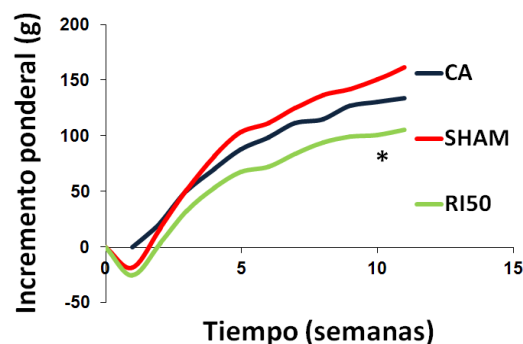


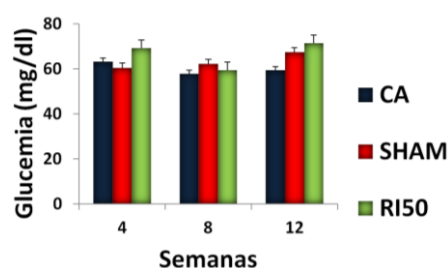
Figura 40. Muestra el incremento ponderal de peso en gramos (g) (eje Y) respecto al tiempo (eje X).

A.2. Resultados de las pruebas funcionales

A.2.1. Medición de glucemias

Las cifras de glucemias que se muestran (Figura 41) son la media mensual de los diversos grupos de animales tras las medidas semanales. Los resultados han sido homogéneos sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres determinaciones. Por esta razón se hace un agrupamiento de los datos, dado que las medias semanales entre sí tampoco mostraban significancia, hemos decidido exponerlas en medias mensuales.

Figura 41. Representa en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en semanas. Existe homogeneidad en los tres grupos y a lo largo de todo el estudio.



A.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

Las curvas de tolerancia intraperitoneal de glucosa (TTIPG) se realizaron cada cuatro semanas, con un total de tres durante el estudio. El estudio estadístico de los TTIPG se realizó mediante el área bajo la curva (ABC). No se realizó estudio estadísticos de las cifras puntales obtenidas durante los distintos tiempos de la curva.

Las curvas obtenidas en los tres controles en el grupo CA fueron muy homogéneas (Figura 42A). Sin embargo, en el caso del grupo S sus curvas variaron con una tendencia a la normalización a lo largo de las semanas. El primer registro mostró una mayor intolerancia glucémica, decreciendo en el segundo y comportándose el tercero como la curva con menor intolerancia (Figura 42B). El grupo RI50 ofreció una curva de intolerancia glucémica crecimiento a la vez que pasan las semanas. A las 12 semanas, a la inversa del grupo S se pudo objetivar el mayor grado de intolerancia (Figura 42C).

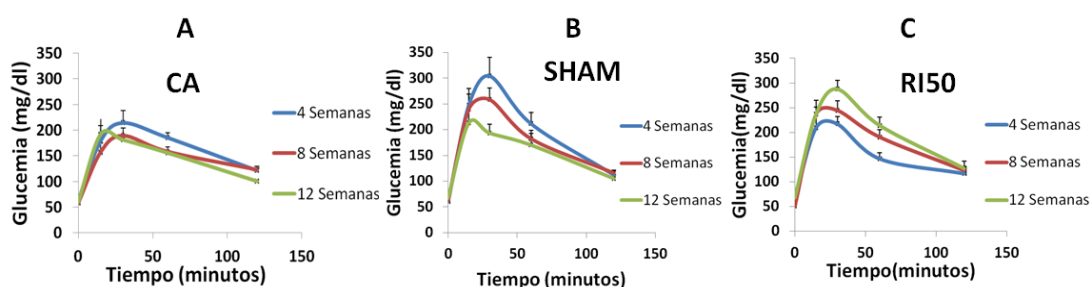
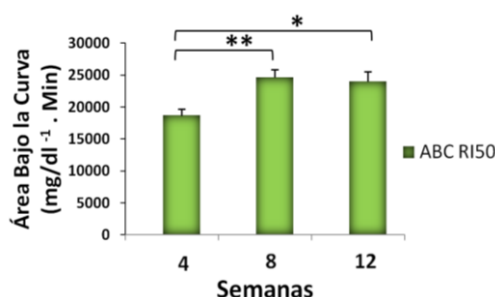


Figura 42. TTIPG de los grupos CA (A), S (B) y RI50 (C). (A), (B) y (C) Muestran en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en minutos. Obsérvese la ausencia de correlación de las curvas entre cada grupo y como estas varía según la semana del test. El único grupo que se comporta homogéneo es el CA.

La valoración del ABC de los TTIPG intragrupos no permitieron objetivar cambios estadísticamente significativos excepto en el grupo RI50 (Figura 43). El ABC del grupo RI50 mostró un aumento estadístico a las ocho ($p \leq 0,01$) (**) y doce semanas, ($p \leq 0,05$) (*) en relación a las cuatro semanas.

Figura 43. Muestra el ABC (mg/dl-1min) del grupo RI50 y los resultados temporales a las 4, 8 y 12 semanas. El ABC está aumentada a las 8 ($p < 0,01$) (**) y a las 12 ($p < 0,05$) (*) con respecto a las 4 semanas.



Si los resultados de los tres test realizados (4, 8 y 12 semanas) y grupos (CA, S y RI50) los agrupamos confrontando los valores de cada experiencia entre los grupos experimentales de animales, nos aportan información adicional (Figura 44).

En el caso del grupo RI50 inicialmente presenta una curva normal, similar al grupo CA. Pero en el segundo y tercer mes se denota una intolerancia marcada, con una tendencia estacionaria. A las cuatro semanas el grupo S muestra una curva de intolerancia glucémica en relación al grupo control no quirúrgico y al grupo con resección intestinal (Figura 44A). En el segundo test realizado (Figura 44B), a las ocho semanas, tanto el grupo S como el RI50 muestran una intolerancia glucémica con respecto al grupo control no quirúrgico (CA). A las 12 semanas el grupo RI50 permanece con una curva elevada, sin embargo los grupos controles en este momento son superponibles (Figura 44C).

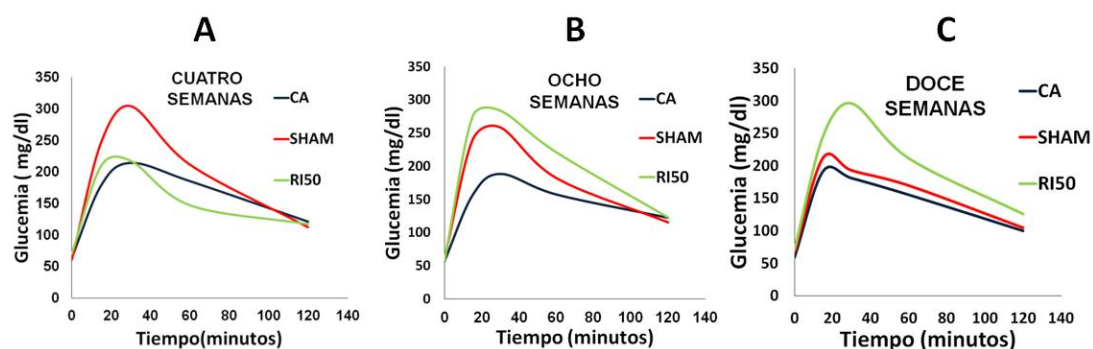
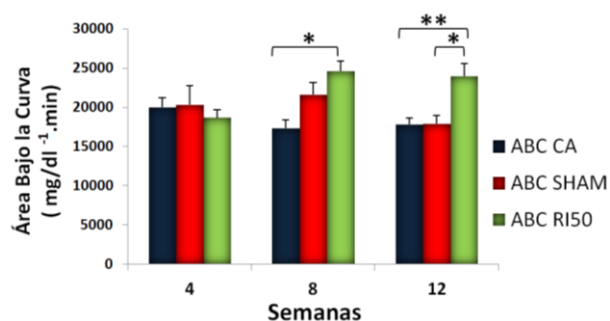


Figura 44. TTIPTG a las 4 semanas de los grupos CA, S y RI50 (A), a las 8 semanas de los grupos CA, S y RI50 (B) y a las 12 semanas de los grupos CA, S y RI50 (C). (A), (B) y (C) muestran en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en minutos.

El estudio estadístico del ABC en los tres grupos objetiva la ausencia de diferencias estadísticas el primer mes. En el segundo, existen diferencias significativas entre el ABC del grupo CA y RI50 ($p < 0,05$) (*). En el tercer mes aparecen diferencias estadísticamente significativas entre el ABC del RI50 y ambos grupos controles, CA ($p < 0,01$) (**) y S ($P < 0,005$) (*) (Figura 45).

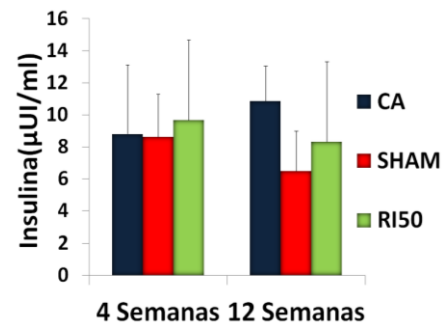
Figura 45. Muestra la relación entre ABC como (mg/dl-1min) y puntos temporales en cada grupo a las 4, 8 y 12 semanas entre los grupos CA, S y RI50.



A.2.3. Medición insulinemia basal

Los datos relativos a los valores de insulinemias basales obtenidos en nuestros animales tras los dos test realizados durante el período postquirúrgico. No muestran diferencias entre los grupos controles, ni entre estos y el grupo RI50 (Figura 46).

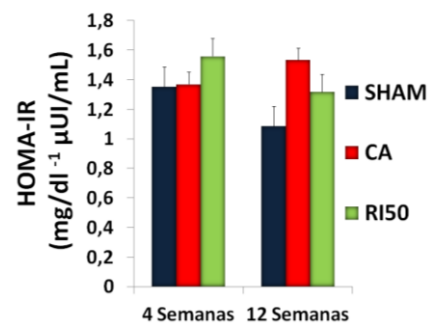
Figura 46. Muestra la representación de la insulinemia basal en $\mu\text{UI/ml}$ en el eje Y, a las 4 y 12 semanas en el eje X. Predomina la homogeneidad en los tres grupos y en los dos períodos.



A.2.4. Test de resistencia insulínica

El test de HOMA-IR, posee como variables la glucemia y la insulina, y nos permite extrapolar valores para la resistencia insulínica a partir de estos parámetros a las 4 y 12 semanas de supervivencia tras la cirugía. En términos de resistencia insulínica no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Figura 47).

Figura 47. Muestra la representación de los valores HOMA-IR para resistencia insulínica en $\text{mg/dl} \cdot \text{l}^{-1} \mu\text{UI/ml}$ en el eje Y, temporalmente a las 4 y 12 semanas (eje X).



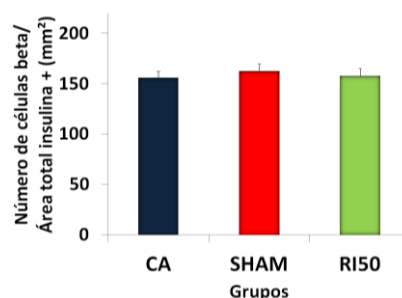
A.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreáticas

Los cambios celulares referidos a la población celular beta aparecidos en el islote pancreático, tras la realización de la RI50 y el periodo de supervivencia (12 semanas), parecen darse a expensas de la proliferación celular principalmente (Figura 49). Existe además una tendencia a una disminución en la tasa de apoptosis, sin ser estadísticamente significativas (Figura 51).

A.3.1. Estudio del número de células beta pancreática

Los datos obtenidos no muestran diferencias significativas entre los tres grupos, estos se presentan homogéneos (Figura 48).

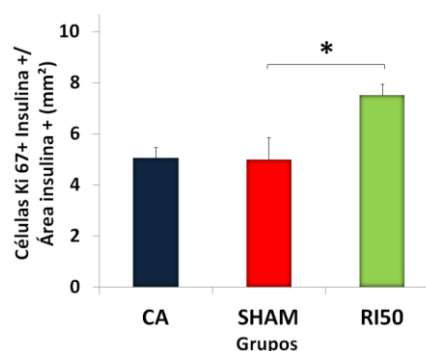
Figura 48. Representa el número de células beta/área total insulina + en mm^2 en el eje Y en cada uno de los grupos de animales (eje X).



A.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática

En el grupo RI50 se produce un aumento en la tasa de proliferación de las células beta a nivel del islote pancreático estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (*) respecto a sus grupos controles (Figura 49).

Figura 49. Muestra la tasa de proliferación de la población celular beta tras la extirpación del 50% intestino delgado (RI50) y de los grupos controles (eje X), expresados como número de células Ki67+ e insulina+/área total insulina + (mm^2) en el eje Y.



A.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas

No se observan diferencias cuantitativas de visu tras el estudio de neogénesis en estos tres grupos (CA, S y RI50) (Figura 50).

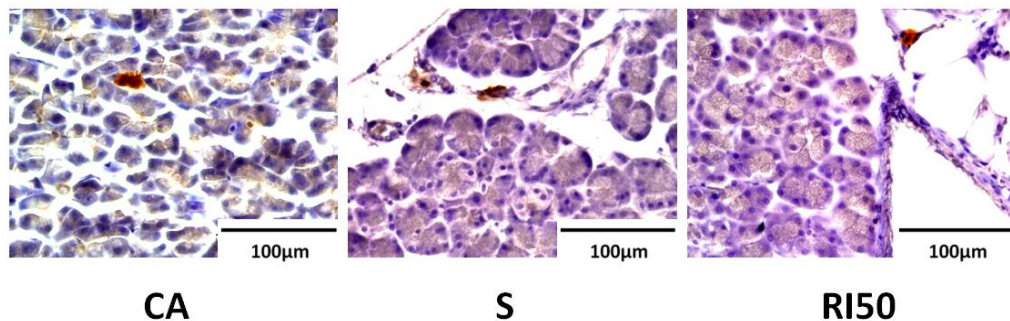
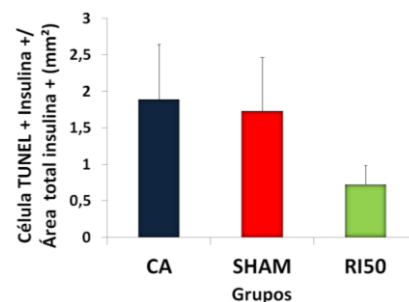


Figura 50. Tras incubar con anticuerpos anti PDX-1, revelado con DAB y contratinción con Hematoxilina de Harris, aparecen marcados en las muestras correspondientes a los grupos control y el grupo problema pequeños grupos celulares o “clusters” PDX-1+. Estos son indicadores, en caso de hallarse elevado el número, de un fenómeno de neogénesis o formación de células beta a partir de precursoras no beta.

A.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta

Si bien no aparecen diferencias significativas entre los grupos, si que existe una discreta tendencia descendente en la tasa de apoptosis en el grupo quirúrgico (RI50). En los grupos CA y S esta tasa se observa mucho más homogénea (Figura 51).

Figura 51. La tasa de apoptosis de la población celular beta tras la extirpación del 50% intestino delgado (RI50) y grupos controles (eje X) expresada como número de células TUNEL+ e insulina +/área total insulina + por mm² en el eje Y.



A.4. Resultados del estudio de la histomorfometría y la masa de células beta

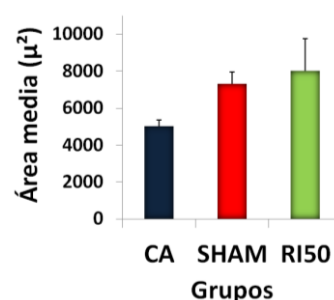
A.4.1. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas

Los cálculos histomorfométricos se han llevado a cabo mediante un microscopio Olympus (modelo BX4) acoplado a una cámara (modelo DP71) y un programa informático de análisis de imagen (Image J®), a partir de muestras de tejido pancreático de los distintos grupos inmunomarcados para el marcaje de insulina. Los resultados se muestran a continuación en los siguientes histogramas (Figura 52 y 53).

A.4.1.1. Área media de los islotes

No existen diferencias significativas entre los tres grupos, aunque el área media de los islotes del grupo RI50 presenta una tendencia alcista frente a los grupos controles (Figura 52).

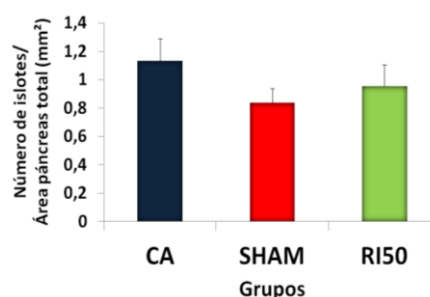
Figura 52. Esta figura muestra el área media de los islotes expresada en μ^2 en el eje Y en cada uno de los grupos de estudio (eje X).



A.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total

En este parámetro histomorfométrico los datos obtenidos no arrojaron diferencias significativas en ningún caso (Figura 53).

Figura 53. El número de islotes /área de páncreas total en mm^2 en el eje Y en cada uno de los grupos a estudio (eje X).

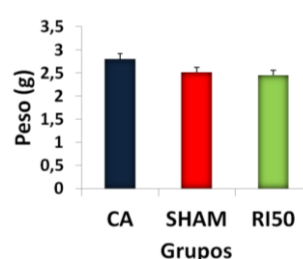


A.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta

El análisis de las secciones del páncreas incubadas con antisueros contra insulina y contrateñidas con hematoxilina de Harris se han realizado mediante un equipo de análisis de imagen informático (Image J[®]), previo escaneo de los portas con del programa Nikon Scan[®] instalado en el ordenador.

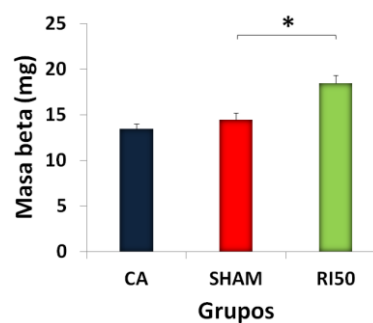
Un factor importante involucrado en el cálculo de la masa celular beta es el peso total de los páncreas de cada uno de los animales de cada grupo a estudio. La media de los pesos de los tres grupos fue similar (Figura 54).

Figura 54. Muestra el peso total medio del páncreas expresado en gramos (g) (eje Y) en cada uno de los grupos (eje X). La media de los pesos de los tres grupos son similares.



Los resultados del cálculo de la masa beta media arrojó un aumento significativo de la masa celular beta en el grupo RI50 ($P > 0,05$) (*) respecto a sus controles. El CA y S fueron equiparables sin diferencias entre ellos (Figura 55).

Figura 55. Muestra la masa celular beta media del páncreas expresado en miligramos (mg) (eje Y) en cada uno de los grupos (eje X).



B. GRUPOS TRAS CIRUGÍA CON BY-PASS GÁSTRICO VS. GRUPOS CONTROLES

B.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso

La evaluación tanto de la ingesta como la ganancia ponderal se realizó de manera idéntica a como se llevó a cabo en el grupo anterior (RI50). Las ratas del grupo BG también estuvieron sometidas a dieta líquida los primeros días, por lo que la ingesta tampoco fue cuantificada en estos.

En el caso de la cirugía con BG se ha comprobado que los animales sometidos a esta intervención se comportan de manera muy similar en lo relativo a la ingesta. Esta fue ligeramente inferior durante los primeros quince días en el grupo BG, posteriormente se equipara en los tres grupos (Figura 56). El incremento de peso de los tres grupos tuvo un comportamiento similar (sin diferencias estadísticas). Los grupos quirúrgicos, S y BG, se incorporan a la curva del grupo CA a partir de la 2-3 semana (Figura 57).

Figura 56. La gráfica muestra ingesta en gramos (g) (eje Y) frente a tiempo en días (eje X) durante el primer mes de supervivencia de las ratas CA, S y BG.

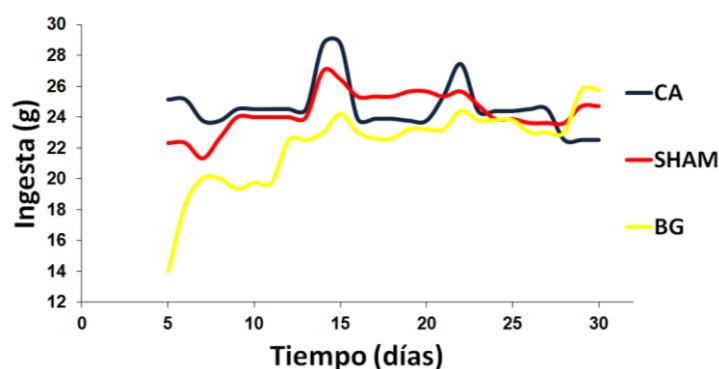
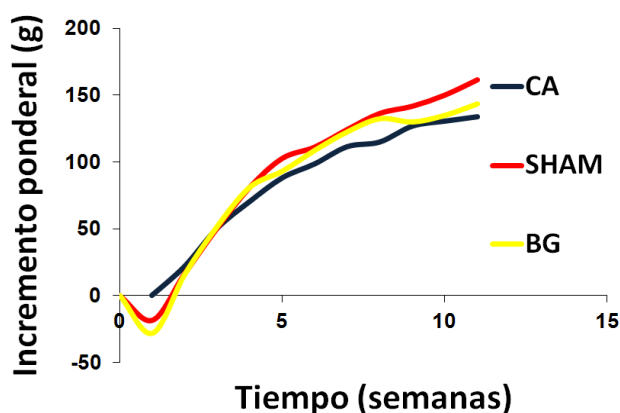


Figura 57. Muestra el incremento ponderal de peso en gramos (g) (eje Y) respecto al tiempo (eje X) en semanas. No hubo diferencias entre los tres grupos.

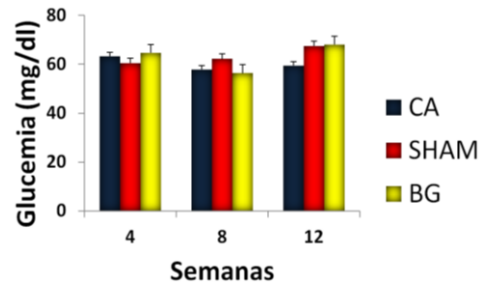


B.2. Resultados de las pruebas funcionales

B.2.1. Medición de glucemias

Realizadas con la misma metodología que en el caso del estudio del grupo RI50, los valores de las glucemias basales fueron similares en los tres grupos CA, S y BG, sin diferencias significativas en ningún momento de los estudiados (Figura 58).

Figura 58. Representa en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en semanas de los grupos controles y el BG.

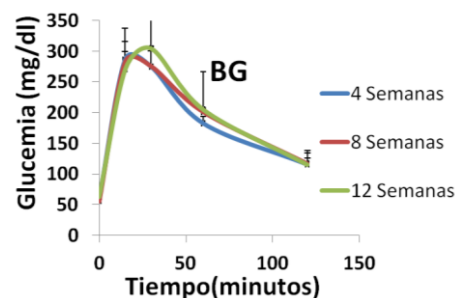


B.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

En el caso del estudio de los resultados en los grupos S y CA durante los tres puntos de estudios del periodo de supervivencia, la realización del TTIPG nos aportaron los datos mostrados en el apartado A.2.2.

En el caso del TTIPG en el grupo sometido a cirugía con BG tenemos que decir que las curvas, en los tres test, desde las cuatro semanas han ofrecido curvas similares (Figura 59). Cabe destacar que esta similitud es a base de curvas con picos glucémicos a los 15 y 30 minutos elevados.

Figura 59. Muestra en el eje Y los valores de glucosa en sangre en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en minutos de duración del test de sobrecarga.



Los resultados derivados del TTIPG observados por momentos de estudios (cada cuatro semanas) y grupos experimentales, al comparar con el grupo sometido a BG fueron los siguientes (Figura 60). El grupo S y el BG en el primer test (a las 4 semanas de la intervención) se comportan de manera parecida, con una intolerancia más acusada en relación con el grupo CA (Figura 60A). En el segundo test realizado, el grupo sometido a

cirugía con BG y S continúa mostrando una intolerancia en relación al grupo CA (Figura 60B). Por último en el tercer test realizado a las 12 semanas, la curva del grupo S continúa su tendencia a ser mas aplanada, prácticamente solapable con el grupo CA. El BG permanece con cifras glucémicas incluso ligeramente más elevadas que en los dos test previos (Figura 60C).

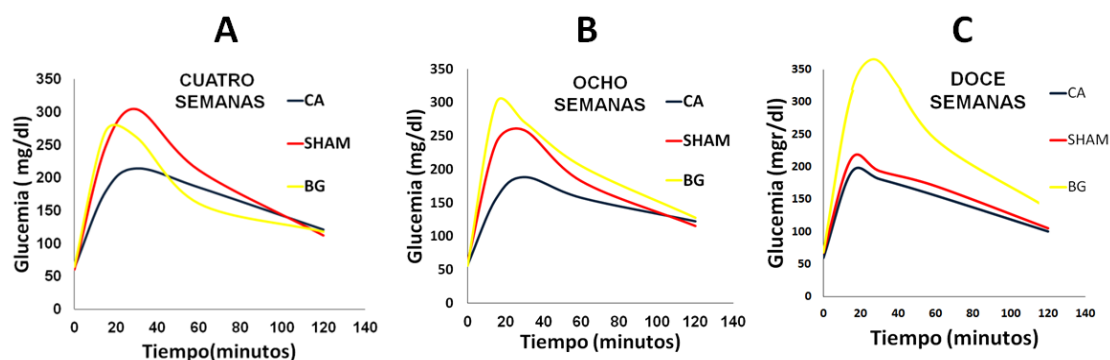
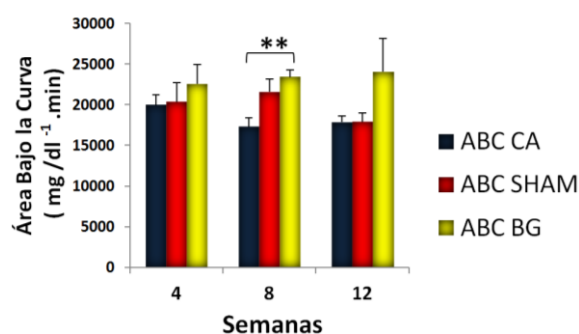


Figura 60. TTIPG a las 4 semanas (A), 8 semanas (B) y 12 semanas (C) de los grupos CA, S y BG. (A), (B) y (C) muestran en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en miligramos por decilitro (mg/dl) y en el eje X el rango temporal en minutos.

Área bajo la curva

El ABC medio de los animales sometidos a cirugía tipo BG posee diferencias significativas con el grupo CA a las ocho semanas tras la intervención ($p < 0,01$) (**). En el resto de los puntos temporales estudiados, 4 y 12 semanas, no se objetivan diferencias estadísticas, aunque en el tercer test existe una importante tendencia (Figura 61).

Figura 61. Muestra la relación entre ABC de los grupos CA, S y BG como ($\text{mg/dl}^{-1} \text{ min}$) y puntos temporales en cada grupo a las 4, 8 y 12 semanas.

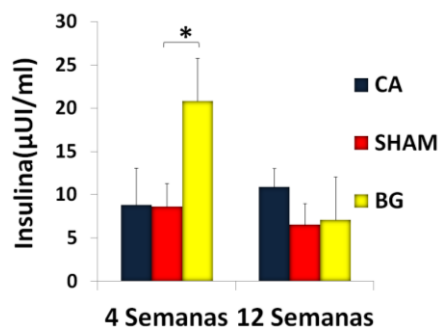


B.2.3. Medición insulinemia basal

Los datos relativos a este punto fueron obtenidos siguiendo el mismo protocolo que en el caso de los animales sometidos a RI50.

El grupo de animales sometidos a cirugía con BG (Figura 62), posee cifras elevadas estadísticamente significativas en el punto de control correspondiente a las 4 semanas tras la intervención en relación al grupo CA y S ($p>0,05$) (*). En el otro punto temporal estudiado, 12 semanas tras la intervención, no se apreciaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. Esta elevación es transitoria y se encuentra normalizada ocho semanas después.

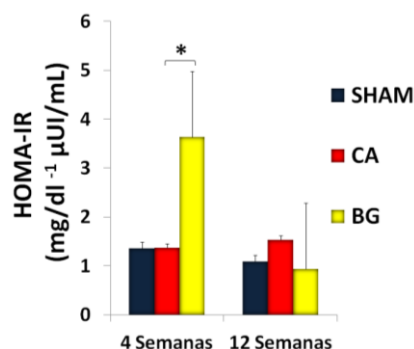
Figura 62. Muestra la representación de la insulinemia basal en $\mu\text{UI/ml}$ en el eje Y. El eje X muestra el momento temporal de la determinación de los grupos controles y BG.



B.2.4. Test de resistencia insulínica

Al igual que en el caso del grupo RI50, utilizamos el test HOMA-IR como fue descrito en el apartado A.2.4. Los valores para el test HOMA-IR relativos a los animales sometidos a BG se encuentran aumentados de manera estadísticamente significativo ($p>0,05$) (*) respecto a los controles en el punto de control correspondiente a las 4 semanas tras la intervención (Figura 63). Se observa una gráfica similar a su homónima de la insulinemia basal (Figura 62).

Figura 63 Muestra la representación de los valores HOMA-IR para resistencia insulínica en $\text{mg/dl}^{-1} \mu\text{UI/ml}$ en los puntos donde se analizaron la insulinemias basales (4 y 12 semanas).



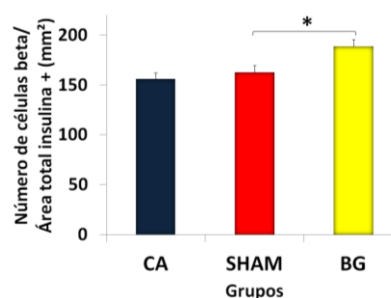
B.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática

Tras la cirugía mixta a nivel gástrico e intestinal se observan cambios estadísticamente significativos a nivel pancreático por diversos mecanismos: aumento del número de células beta, proliferación y neogénesis (Figuras 64, 65 y 66) La apoptosis parece tener una tendencia al descenso pero sin diferencias estadísticas (Figura 67).

B.3.1. Estudio del número de células beta pancreática

Se muestra un aumento del número de células beta con relación al área correspondiente a los islotes en el grupo BG respecto a los grupos control, y de forma estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (*) (Figura 64).

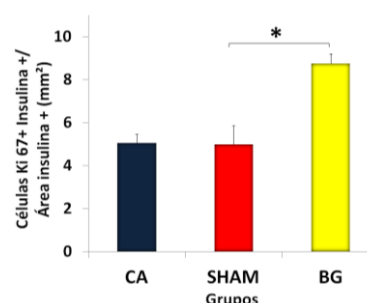
Figura 64. Representa el número de células beta/área total insulina + en mm^2 (eje Y) en cada uno de los grupos estudiados en este apartado (eje X).



B.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática

El BG muestra una tasa aumentada de proliferación celular beta mayor que la de los dos grupos controles de manera significativa ($p > 0,05$) (*) (Figura 65).

Figura 65. Muestra la tasa de proliferación de la población celular beta del grupo experimental BG frente a los grupos controles (eje X), expresada como número de células Ki67+ e insulina+/área total insulina + (mm^2) (eje Y).



B.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas

La cirugía del BG muestra un aumento cualitativo del marcaje con PDX-1. Tanto a nivel periférico como en el propio parénquima respecto a sus controles (microfotografías marcadas con las siglas CA, S y BG) (Figura 66).

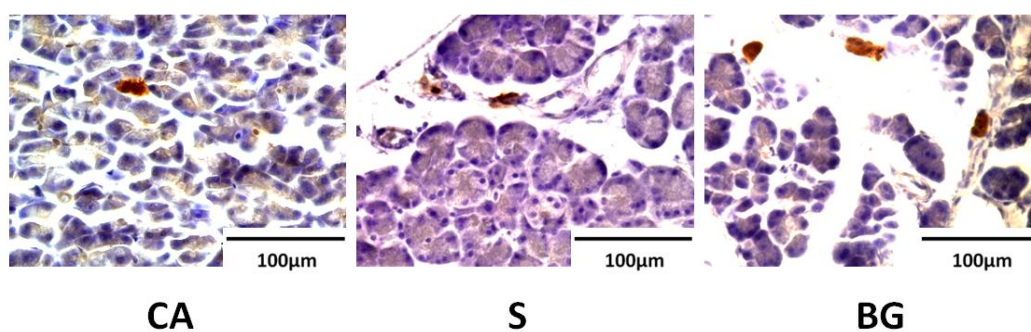
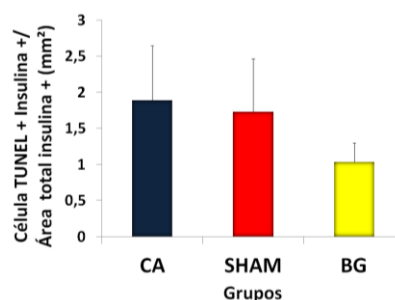


Figura 66. Estudio de la neogénesis según el protocolo descrito en el material y método en el apartado A.3.3. En los grupos controles se puede observar los pequeños grupos celulares o “clusters”PDX-1+, este se encuentra más elevado en el grupo BG.

B.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática

Si bien no aparecen diferencias significativas entre los tres grupos, el BG presenta la tendencia a una menor tasa de apoptosis (Figura 67).

Figura 67. Muestra la tasa de apoptosis de la población celular beta en muestras del BG (grupo problema) y grupos controles (eje X), expresada en términos cuantificables como número de células TUNEL+ e insulina+/área total insulina + (mm^2).



B.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta

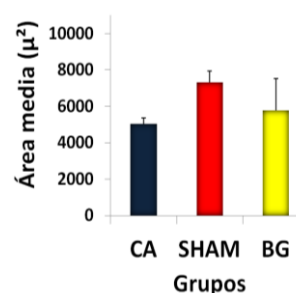
No observamos cambios a nivel histomorfométrico en el grupo de animales sometidos a BG. Los mecanismos fisiológicos que acontecen en el islote por lo tanto parecen influir de manera homogénea en los islotes pancreáticos de los tres grupos de animales estudiados.

B.4.1. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas

B.4.1.1. Área media de los islotes

La media los islotes son similares en el grupo CA, S y BG; si bien en el caso de los animales del grupo control quirúrgico parecen presentar una tendencia al incremento del valor de la media de las áreas de sus islotes. No obstante como hemos dicho sin diferencias significativas (Figura 68).

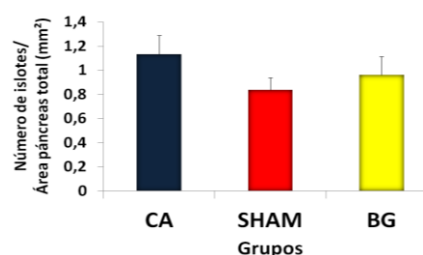
Figura 68. Esta figura muestra el área media de los islotes expresada en μ^2 en el eje Y en cada uno de los grupos relacionados en este apartado (eje X).



B.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total

El número de islotes por área es similar en los animales de los tres grupos sin objetivarse diferencias significativas entre ellos (Figura 69).

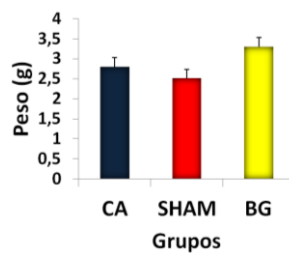
Figura 69. Esta figura muestra el número de islotes/área de páncreas total en mm^2 en el eje Y en cada uno de los grupos (eje X).



B.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta

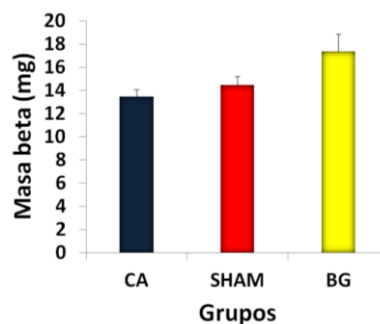
Al igual que en el caso anterior correspondiente al estudio del grupo RI50 hemos valorado en primer lugar el peso total del páncreas como requisito previo para el cálculo de la masa celular beta. Los pesos de los páncreas del grupo BG parecen ser más elevados de manera global. No obstante sin diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 70).

Figura 70. Muestra el peso total medio del páncreas expresado en gramos (g) (eje Y) en los grupos estudiados (eje X) frente al BG.



La media de la masa celular beta de los páncreas del grupo BG es más elevada que los otros dos grupos. A pesar de no ser significativas las diferencias si existe una marcada tendencia al alza en este último (Figura 71).

Figura 71. Masa celular beta media del páncreas expresado en miligramos (mg) (eje Y) en los grupos estudiados (eje X).



C. GRUPO TRAS CIRUGÍA CON GV VS. GRUPOS CONTROLES

C.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso

El modelo restrictivo puro (GV) muestra una ingesta inferior y mantenida durante todo el mes con respecto a los grupos controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (*) (Figura 72).

El incremento ponderal del grupo GV es ostensiblemente inferior a los grupos controles con una importante significación estadística ($p > 0,01$) (**). Al igual que los animales correspondientes al grupo S, los correspondientes al grupo GV sufren una pérdida de peso al inicio a consecuencia de la cirugía (Figura 73).

Los primeros cinco días toleraron dieta líquida como ya se ha comentado. La GV es el grupo más influenciado por la cirugía que induce tanto una menor ingesta como un menor incremento ponderal de peso.

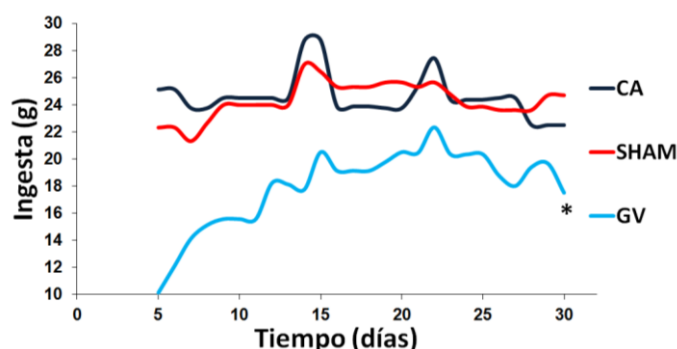


Figura 72. La gráfica muestra una ingesta en gramos (g) (eje Y) frente al tiempo en días (eje X) durante el primer mes comparando los grupos controles y el grupo GV.

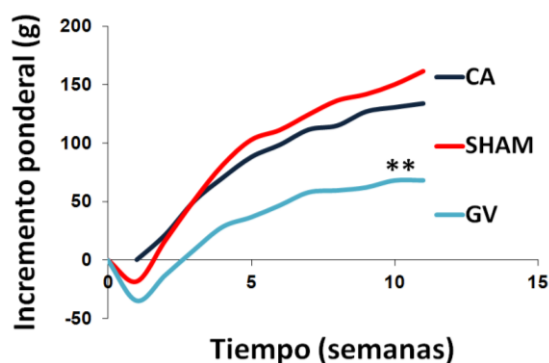


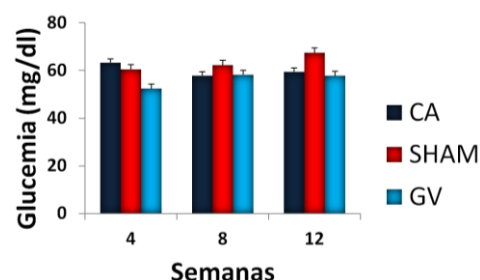
Figura 73. Muestra el incremento ponderal de peso (g) (eje Y) respecto al tiempo (semanas) (eje X).

C.2. Resultados de las pruebas funcionales

C.2.1. Medición de glucemias

Las ratas del grupo restrictivo se comportan igual que los controles en relación a las cifras de glucemia basal en cualquiera de los tres puntos temporales a estudio (4, 8, y 12 semanas). Por lo que no se encontraron diferencias significativas en esta parte del estudio (Figura 74).

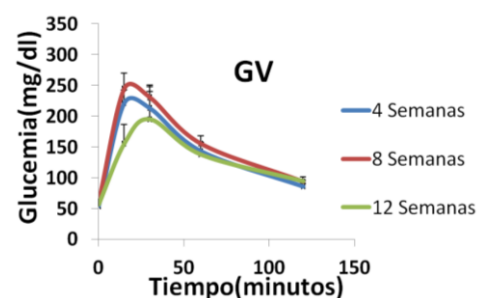
Figura 74. Representan las glucemias a lo largo del estudio entre los grupos controles y GV. En el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en mg/dl, durante el rango temporal en semanas del estudio (eje X).



C.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

En el caso de los dos grupos controles, la realización del TTIPG en los tres test desarrollados durante la experiencia, nos remitimos a los datos ya mostrados en el apartado A.2.2. Los resultados del TTIPG para el grupo de ratas sometidas a cirugía de GV mostraron unas curvas a las cuatro y ocho semanas similares. A las doce semanas la curva fue ligeramente inferior (Figura 75).

Figura 75. Muestra el TTIPG del grupo GV. En el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en mg/dl y en el eje X el rango temporal en minutos. .



Los TTIPG de los grupos controles y el de GV muestra que a las cuatro semanas el grupo S sufre de glucemias algo más elevadas durante la realización de este test a la cuarta semana. Las ratas del grupo GV se comportan parecidas al CA (Figura 76A). Los resultados del test realizado en la octava semana de supervivencia tras la intervención nos muestran que los animales de los grupos S y GV se comportan con cifras glucémicas superiores al grupo CA, siendo similares ambos en este segundo test (Figura 76B). El test realizado en la decimosegunda semana muestra unas curvas de glucemia en los tres grupos a estudio prácticamente solapables (Figura 76C).

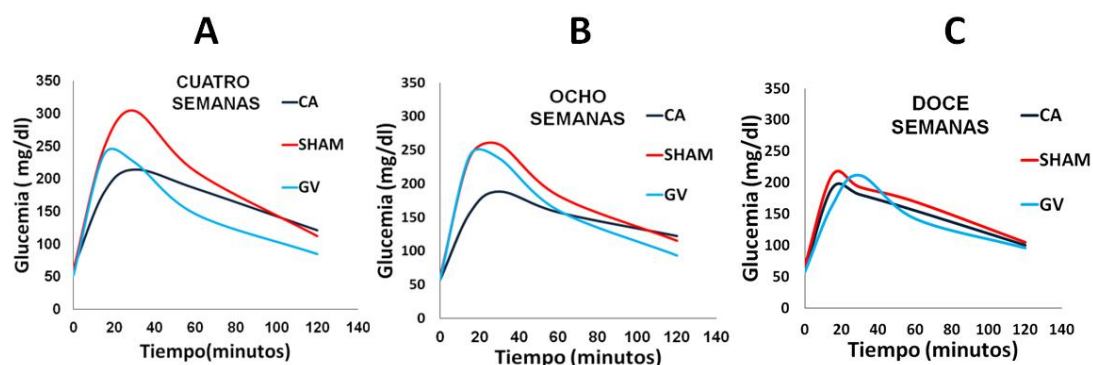
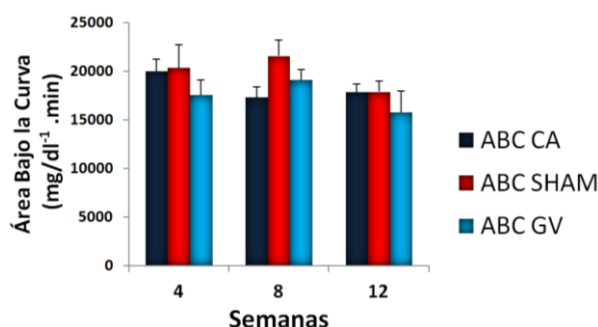


Figura 76. Secuencia de TTIPG de los grupos controles y GV durante los tres test realizados. (A) 4 semanas, (B) 8 semanas y (C) 12 semanas. En los tres test, se muestra en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en mg/dl, en la evolución temporal en minutos del test (eje X).

Área bajo la curva

En ninguno momento existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las ABCs correspondientes a los animales del grupo GV y de ambos grupos controles (Figura 77).

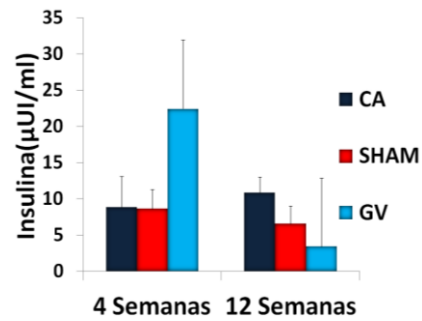
Figura 77. Muestra la relación entre ABC como ($\text{mg/dl}^{-1} \text{ min}$) en los tres test llevados a cabo y los grupos a estudio (CA, S y GV).



C.2.3. Medición insulinemia basal

Los datos relativos a este punto fueron obtenidos siguiendo el mismo protocolo que en el caso de los animales sometidos a RI50 o BG. En los resultados relativos a los valores de insulina basal media en los animales del grupo GV, no se han obtenido datos que marquen diferencias estadísticamente significativas con los grupos controles. Si bien hay que destacar la amplitud y grado de dispersión de los resultados obtenidos, tal y como se aprecia en las barras de error de la gráfica correspondiente (Figura 78).

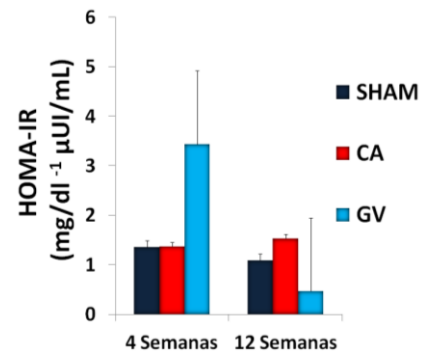
Figura 78. Muestra la representación de la insulinemia basal en $\mu\text{UI/ml}$ en el eje Y en los puntos de obtención de sueros. En el eje X el momento temporal cuantificado.



C.2.4. Test de resistencia insulínica

Al igual que en los casos anteriores utilizamos el test HOMA-IR por los motivos descritos en el apartado A.2.4.. Los resultados del test de HOMA-IR arrojan unos valores en el caso de los animales sometidos a GV, iguales a los de los animales pertenecientes a los grupos control, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Destaca el grado de dispersión de los datos en el caso del grupo GV, esto implica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre grupos, pese a las aparentes diferencias entre los valores a estudio (Figura 79).

Figura 79. Muestra la representación de los valores HOMA-IR para resistencia insulínica en $\text{mg/dl}^{-1} \mu\text{UI/ml}$, en los puntos de obtención del suero (eje Y). En el eje X el momento cronológico de la extracción de los grupos a estudio (CA, S y GV).



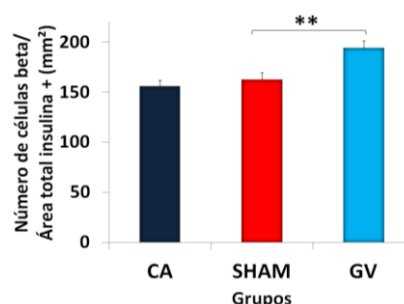
C.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática

Los mecanismos fisiológicos ocurridos en la masa de células beta de los animales tras la exéresis parcial del estómago se centran básicamente en el aumento del número de células beta (Figura 80) y la bajada de las tasas de proliferación (Figura 81). No se producen aparentemente mecanismos que implique una mayor tasa de diferenciación celular a células beta (mecanismos de neogénesis-Figura 82) y no se aprecian diferencias significativas en las tasas de apoptosis entre las poblaciones beta de los animales del grupo sometido a GV y de los grupos control (Figura 83).

C.3.1. Estudio del número de células beta pancreática

Existe un aumento del número de células por área de islotes en el grupo GV estadísticamente significativo ($p > 0,01$) (**) respecto a sus controles (Figura 80).

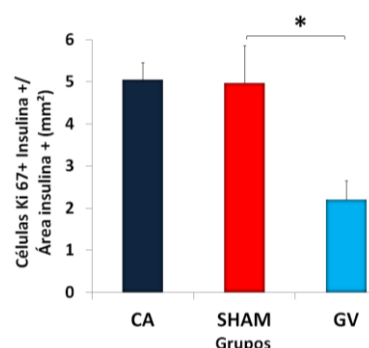
Figura 80. Representa el número de células beta/área total de insulina + en mm^2 en el eje Y en cada uno de los grupos a estudio de este apartado (eje X).



C.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática

La gráfica muestra que el número de células identificadas como Ki67+ que contienen insulina en su citoplasma está disminuida de manera estadística ($p > 0.05$) en el grupo GV en comparación a los grupos CA y S (Figura 81).

Figura 81. Muestra la tasa de proliferación de la población celular beta en el grupo de animales GV frente a los grupos controles (eje X) expresada como número de células Ki67+ e insulina+/área total insulina + (mm^2) (eje Y).



C.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas

Como referimos anteriormente, el empleo de un antisuero frente a la proteína PDX-1+, nos pone de manifiesto la presencia de pequeños grupos celulares o “clusters” PDX-1+ que indica el fenómeno de neogénesis. No existen diferencias cualitativas en el número de “clusters” PDX-1+ entre los tres grupos de este apartado (Figura 82).

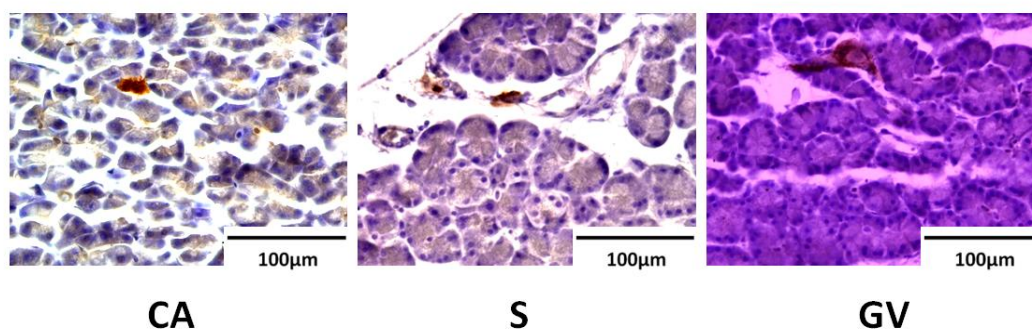
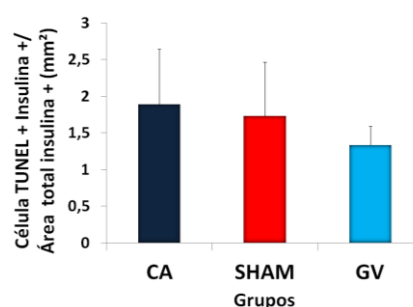


Figura 82. La neogénesis en la GV es similar a los controles, no se observan diferencias en las tinciones de los distintos tejidos.

C.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática

La tasa de apoptosis en la población de células beta pancreáticas en los animales a los que se realiza la GV parece mostrar una tendencia al descenso -no significativa estadísticamente- respecto a los grupos controles (Figura 83).

Figura 83. Muestra la tasa de apoptosis de la población celular beta del grupo GV y grupos controles expresada como número de células TUNEL+ e insulina+/área total de insulina + (mm^2).



C.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta

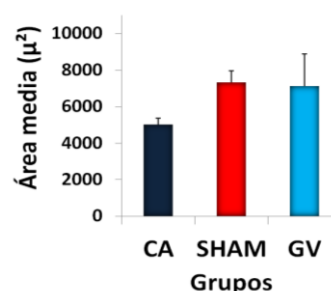
C.4.1. Histomorfometría

Al igual que en el RI50 y el BG, tras la GV no aparecen diferencias estadísticamente significativas en los valores correspondientes al área media ni al número de islotes en relación al área total del páncreas, en los animales parcialmente gastrectomizados frente a los controles (Figura 83 y 84). Tan solo tendencias no justificables estadísticamente hablando y, por lo tanto, sujeta a una valoración poco objetiva.

C.4.1.1. Área media de los islotes pancreáticos

La media de los islotes pancreáticos es similar en el grupo S y GV. En el caso de grupo CA el tamaño medio si bien parece ser menor, no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros dos grupos (Figura 84).

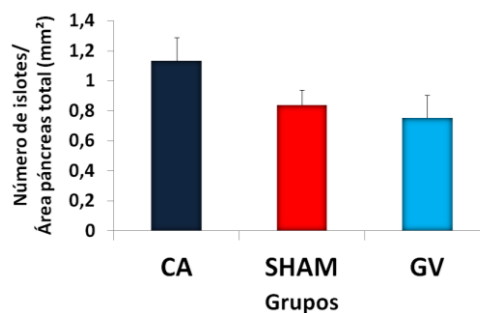
Figura 84. Esta figura muestra el área media de los islotes en μ^2 en el eje Y en cada uno de los grupos estudiados en este apartado (eje X).



C.4.1.2. Número de islotes/área páncreas total

El grupo de GV muestra una tendencia a tener un número de islotes por área inferior a los controles, sin ser significativo (Figura 85).

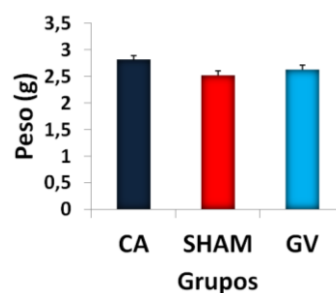
Figura 85. Esta figura muestra el número de islotes /área de páncreas total en mm² en el eje Y en cada grupo del apartado (eje X).



C.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta

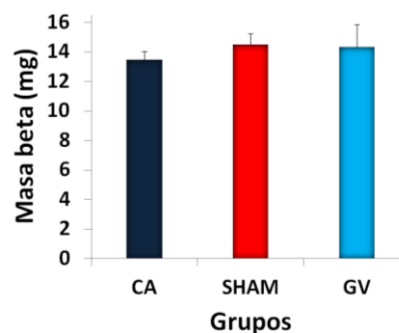
Al igual que en los casos anteriores correspondiente al estudio de los grupos RI50 y BG, hemos valorado en primer lugar el peso total del páncreas como requisito previo para el cálculo de la masa celular beta. Las ratas intervenidas mediante gastroplastia presentan un peso pancreático igual a los controles (Figura 86).

Figura 86. Muestra el peso total medio del páncreas en gramos (g) (eje Y). Los grupos problema (CA, S y GV) se muestran en el eje X.



La masa celular beta de los páncreas correspondientes a los animales del grupo sometido a cirugía con GV y los grupos control no poseen diferencias estadísticas (Figura 87).

Figura 87. Muestra la masa celular beta media del páncreas expresado en mg (eje Y). Los grupos de estudio en el eje X.



D. RESULTADOS AGRUPADOS

A continuación se presentan los datos correspondientes a cada uno de los parámetros estudiados dentro de este trabajo en relación a los tres grupos quirúrgicos y sus controles. Si bien la valoración de estos puede resultar en principio un tanto compleja si creemos ofrece una rica visión de conjunto total de la línea experimental. Sin ánimo de entrar a valorar los resultados, en algún caso realizamos una somera interpretación de los mismos, a fin de facilitar su interpretación.

D.1. Resultados de la ingesta e incremento de peso

En relación a la ingesta, en cada uno de los grupos a estudio se aprecia una disminución de la misma durante el primer mes. Este es más acusado en el grupo GV con significación estadística ($p > 0,05$) (*), seguido del grupo sometido a resección intestinal. El BG se equipara a los grupos controles en su ingesta a partir de los quince días (Figura 88).

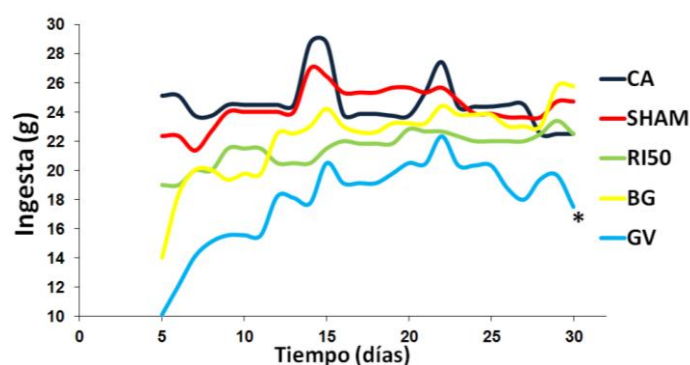


Figura 88. La gráfica muestra ingesta (g) (eje Y) frente a tiempo, en días durante el primer mes (eje X) de cada uno de los grupos a estudio: CA, S, RI50, BG y GV.

El incremento ponderal de peso es claramente inferior en el grupo restrictivo (GV) (estadísticamente significativas $p < 0,01$) (**), seguido del grupo malabsortivo (RI50), también estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (*). El BG se comporta de manera muy similar al grupo S. El incremento ponderal de peso del BG es superior al grupo GV siendo estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (**). Cabe destacar que todos los grupos quirúrgicos, incluido el S, sufren una pérdida de peso en las primeras dos semanas, con evolución diferente a posteriori (Figura 89).

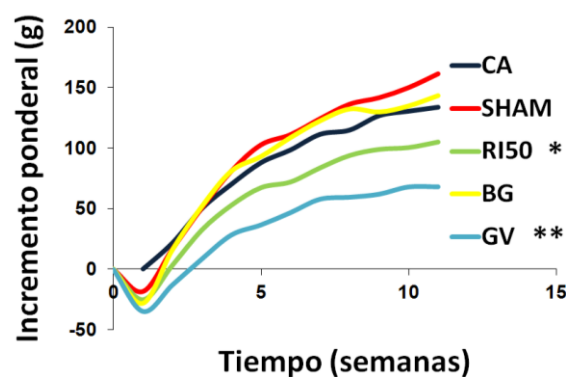


Figura 89. Se muestra el incremento ponderal de peso (g) respecto al tiempo total de estudio (eje X) de los grupos controles y de estudio (RI50, BG y GV).

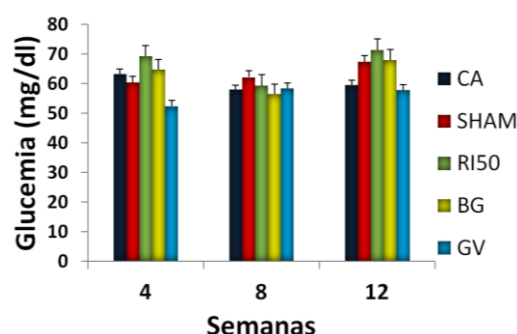
Agrupando ambos parámetros, ingesta e incremento ponderal de peso, parece sensato pensar que las ratas que sufren la gastroplastía, restricción pura estomacal, tengan este comportamiento donde la ingesta queda limitada durante todo el mes de seguimiento. Pero todos los grupos quirúrgicos, incluido aquel que “solo” altera el tránsito intestinal – RI50-, se ven afectados por este cambio en la capacidad de ingesta. Las técnicas quirúrgicas son efectivas como modelo de estudio, ya que la dinámica de ganancia de peso de los animales se ve alterada al menos en un principio. La disminución de la ingesta se encuentra más marcada en el RI50 y GV.

D.2. Resultados de las pruebas funcionales

D.2.1. Medición de glucemias

No deja de ser significativo que, en ausencia de patologías previas sufridas por el animal, las ratas tras la cirugía son capaces de mantener mecanismos homeostáticos de control glucémico. La ausencia de alteraciones en este sentido, en vez de ser una señal de carácter negativo, puede venir a abonar nuestras hipótesis de la existencia de mecanismos complejos que hagan participar al páncreas en esta homeostasis eficaz (Figura 90).

Figura 90. Representa en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en mg/dl y en el eje X el rango temporal en semanas para cada grupo a estudio. Cifras de glucemias basales son homogéneas en todos los grupos sin diferencias significativas.



D.2.2. Test de tolerancia intraperitoneal de glucosa

En el TTIPG a las cuatro semanas todos los grupos quirúrgicos sufren alteraciones en su curva de tolerancia a la glucosa. Las más llamativas son las correspondientes a los animales de los grupos S y BG (Figura 91A). En el segundo test, la intolerancia glucémica es muy homogénea en todos los grupos quirúrgicos. Las cifras de glucemia son más elevadas que el grupo CA. Los animales del grupo S también muestran una curva diferente a los del grupo CA (Figura 91B). Al final del estudio, en la decimosegunda semana, permanecen con curvas elevadas de glucemia los animales de los grupos sometidos a BG y RI50. Respecto al grupo S y al tercer grupo quirúrgico, GV, presentan curvas normalizadas equiparables al CA (Figura 91C).

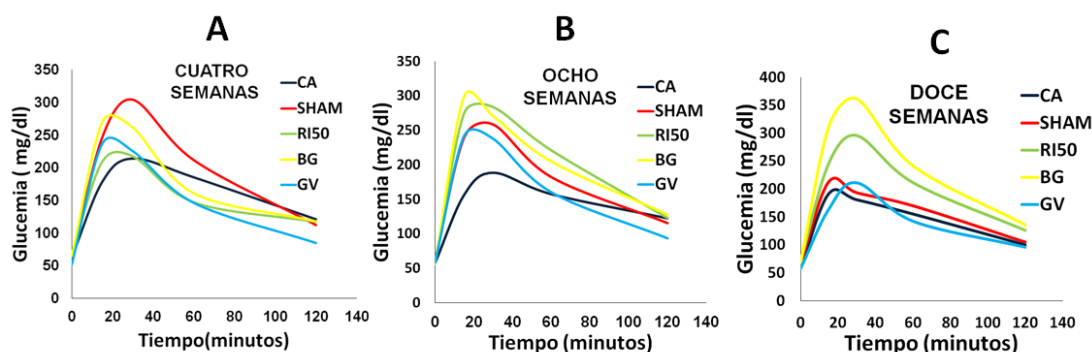


Figura 91. TTIPG de todos los grupos del estudio expresándose en agrupados por momento cronológico del test (4(A), 8(B) y 12(C) semanas). En las tres gráficas se muestra en el eje Y los valores de glucosa en sangre expresados en mg/dl y en el eje X el rango temporal en minutos.

Área bajo la curva

En las ABCs, tras el primer test realizado a las 4 semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A las ocho semanas, los animales del grupo RI50 y BG manifiestan diferencias estadísticamente significativas en relación a los del grupo CA con una $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente. A las doce semanas continúan las diferencias estadísticamente significativas entre las ABCs correspondientes a los animales del grupo RI50 respecto a los grupos CA ($p < 0,01$) y S ($p < 0,05$), no respecto a las del grupo BG. Si comparamos los grupos quirúrgicos del estudio se observan diferencias estadísticamente significativas entre RI50 y GV durante el segundo ($p < 0,05$) y el tercer mes ($p < 0,01$). El grupo GV parece comportarse igual que los grupos controles durante los tres meses (Figura 92).

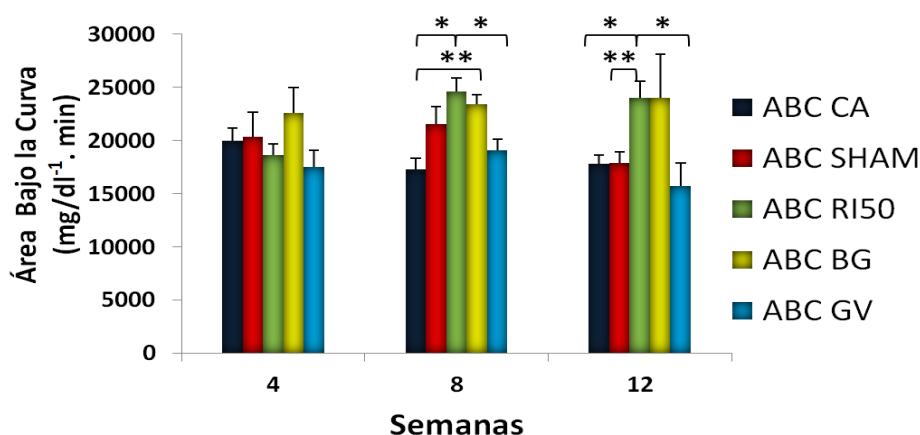
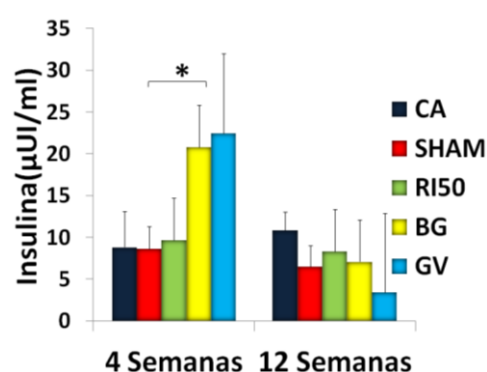


Figura 92. Muestra la relación entre ABC como ($\text{mg/dl}^{-1} \cdot \text{min}$) (eje Y) y puntos temporales en cada grupo a las 4, 8 y 12 semanas (eje X).

D.2.3. Medición insulinemia basal

La agrupación de los datos muestra una clara similitud sin diferencias entre el grupo RI50 y los controles. De manera inversa el grupo BG muestra un aumento estadísticamente significativas de las cifras basales de insulina en sangre en el punto correspondiente a las 4 semanas tras la intervención. El grupo más controvertido es el GV que, aunque posee cifras medias de insulina elevadas, la dispersión de los datos es demasiado amplia y por tanto no se puede hablar de cifras basales elevadas con esta potencia estadística (Figura 93).

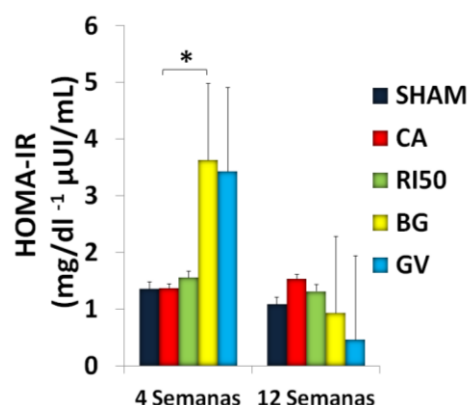
Figura 93. Muestra la representación de la insulinemia basal en $\mu\text{UI/ml}$ en el eje Y en cada medición. En el eje X se aprecian los grupos de estudio y los dos momentos de estudio, 4 y 12 semanas.



D.2.4. Test de resistencia insulínica

La resistencia insulínica es gemela a la insulinemia basal ya que la variable que podría modificar la resistencia insulínica, es decir la glucosa, es similar en todos los grupos. El único grupo que posee un índice de resistencia insulínica elevado es el sometido a BG. Este comportamiento es transitorio, solo observado en el punto correspondiente a la cuarta semana tras la intervención (Figura 94).

Figura 94. Muestra la representación de los valores HOMA-IR para resistencia insulínica en $\text{mg/dl}^{-1} \mu\text{UI/ml}$ en el eje Y, a las 4 y 12 semanas (eje X).

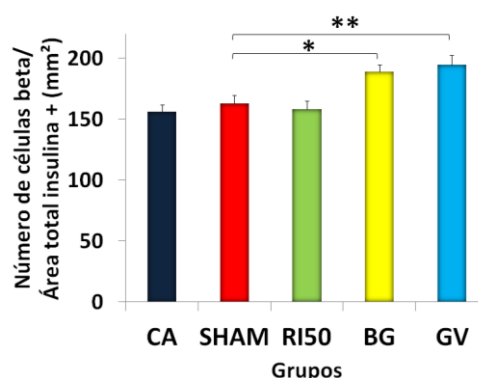


D.3. Resultados inmunohistoquímicos del estudio de la población de células beta pancreática

D.3.1. Estudio del número de células beta pancreática

Se constató un aumento significativo del número de células beta por área de insulina +, ($p < 0,05$) en el grupo BG (*) y ($p < 0,01$) en el grupo GV (**) respecto a las contabilizadas en las muestras de animales de los grupos control. El grupo RI50 se comportó en este sentido igual que los grupos controles como podemos apreciar en la figura (Figura 95).

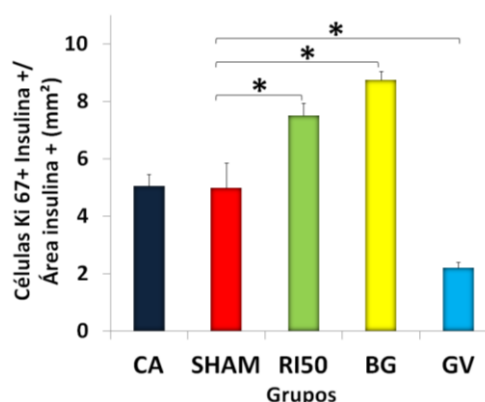
Figura 95. Representa el número de células beta /área total insulina + en mm^2 (eje Y) para cada grupo (eje X).



D.3.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática

La tasa de proliferación está aumentada de manera significativa en los páncreas de los animales de los grupo RI50 (*) ($p < 0,05$) y BG (*) ($p < 0,05$), en relación a los controles y al grupo GV de manera estadísticamente significativa. En el caso de los animales sometidos a GV, no sólo no está elevada la tasa de proliferación sino que se encuentra disminuida de manera significativa en relación a los grupos controles (CA y S) (*) ($p < 0,05$) y a los otros dos quirúrgicos (RI y BG) (Figura 96).

Figura 96. Muestra la tasa de proliferación de la población celular beta tras la cirugía en cada uno de los grupos quirúrgicos y grupos control (eje X) - expresada como número de células Ki67+ e insulina+/área total insulina + (mm^2) (eje Y).



D.3.3. Estudio de la neogénesis en el páncreas

Esta prueba que hemos descrito, nos permite determinar los pequeños grupos celulares o clusters, que se ponen de manifiesto expresando la proteína PDX-1. Dichos clusters + denotan un fenómeno de neogénesis, o formación de células beta a partir de precursoras no beta. El único grupo que mostró un aumento cualitativo a las doce semanas fue el BG (Figura 97).

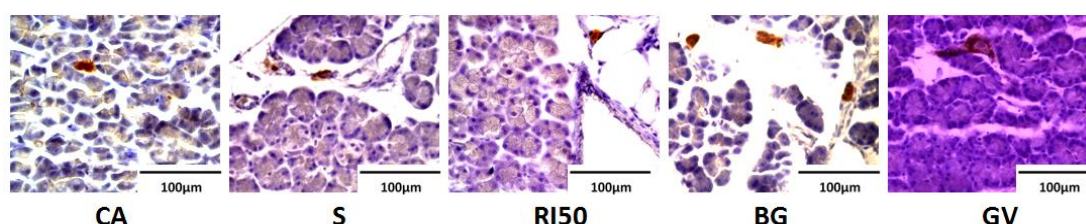
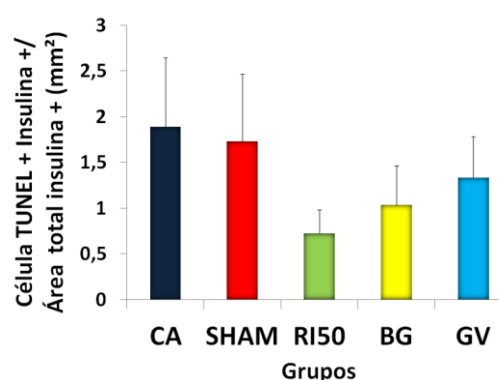


Figura 97. Estudio de neogénesis. Mostró una homogeneidad entre todos los grupos observados, a excepción del grupo BG. En este se observó un aumento significativo de este marcador, tanto en la periferia como en el tejido pancreático.

D.3.4. Estudio de la apoptosis en las células beta pancreática

Existe una homogeneidad de ambos grupos controles en la tasa de apoptosis; de igual manera existe una tendencia, no significativa, a una tasa de muerte celular programada inferior en los tres grupos quirúrgicos, quizás más acentuado en el grupo RI50 (Figura 98).

Figura 98. Muestra la tasa de apoptosis de la población celular beta tras la cirugía en cada uno de los grupos (eje X), expresados como número de células TUNEL+ e insulina+/área total insulina + (mm^2) (eje Y).



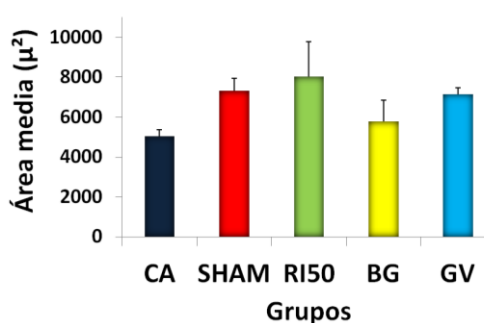
D.4. Resultados del estudio de la histomorfometría del páncreas y la masa de células beta

D.4.1. Histomorfometría

D.4.1.1. Área media de los islotes pancreáticos

La media del área de los islotes es similar en los páncreas de los animales de los grupos S y GV. En el caso de los islotes pancreáticos de los animales del grupo CA el tamaño medio es menor. No obstante, sin diferencias estadísticas entre ellos (Figura 99).

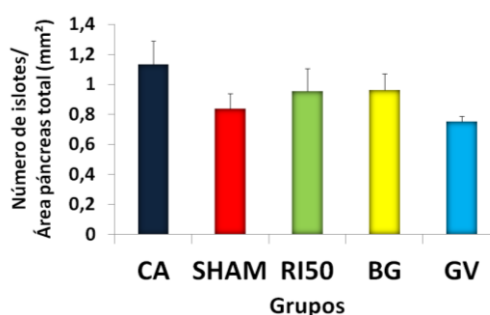
Figura 99. Esta figura muestra el área media de los islotes en μ^2 en el eje Y en cada uno de los grupos a estudio (eje X).



D.4.1.2. Número de islotes/área pancreática total

El grupo de GV muestra una tendencia a tener un número de islotes por área pancreática total inferior a los controles. En cualquier caso sin ser significativo estadísticamente (Figura 100).

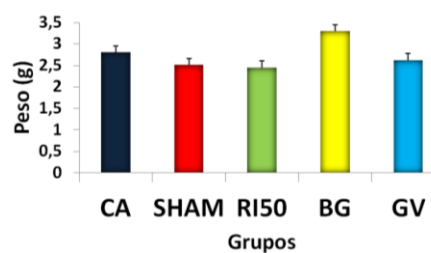
Figura 100. Esta figura muestra el número de islotes /área de páncreas total en mm^2 en el eje Y en cada uno de los grupos a estudio en el eje X.



D.4.2. Resultados del estudio de la masa de células beta

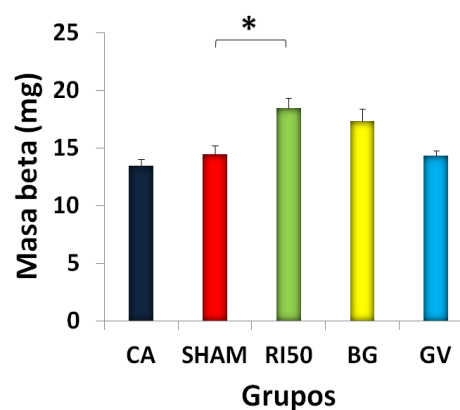
En este caso hemos valorado en primer lugar el peso total del páncreas como requisito previo para el cálculo de la masa celular beta. Este ha sido similar en los todos los grupos, a excepción de los animales del grupo BG, hubo una tendencia no significativa a tener un peso total del páncreas más elevado (Figura 101).

Figura 101. Muestra el peso total medio del páncreas, expresado en gramos (g) (eje Y), para cada uno de los grupos (eje X).



La masa de células beta en los animales de los grupos CA, S y GV se comportan de manera homogénea en relación a este apartado del estudio, no existiendo diferencias significativas entre ellos. Existe un aumento de manera significativa de esta en el grupo RI50 (*). En el grupo BG existe una importante tendencia no significativo a estar elevado (Figura 102).

Figura 102. Muestra la masa celular beta media del páncreas expresado en mg (eje Y). Como resultado del estudio de la masa beta según los grupos quirúrgicos (eje X).



E. RESUMEN DE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL PÁNCREAS

A continuación se comentan los hallazgos más destacados. Obsérvese que hay características comunes y propias entre los diversos grupos quirúrgicos. Ningún de ellos coincide plenamente con los otros dos (Tabla 6).

- Lo primero a destacar son los resultados equiparables de los grupos controles, a pesar de la intervención quirúrgica en el grupo S no acontecen modificaciones.
- La masa beta aumenta de manera significativa en el grupo RI50, en el grupo BG existen una importante tendencia, pero sin llegar a marcar diferencias significativas respecto a sus controles.
- El aumento del número de células beta por área aparecen en el grupo quirúrgico mixto (BG) y el restrictivo (GV) de manera significativa. El tercer grupo, RI50, se comporta como los controles.
- La tasa de proliferación sufre variaciones en los tres grupos quirúrgicos siendo estadísticamente significativas, el RI50 y BG (grupos malabsortivos y mixto) aumenta con respecto a los controles. El grupo GV (restrictivo puro) disminuye.
- La neogénesis solo aparece aumentada en el grupo sometido a BG (técnica mixta), el resto de los grupos se comportan como los controles.
- La muerte celular programada, apoptosis, aparece en menor cuantía, solo como tendencia, sin ser significativa en los tres modelos bariátricos respecto a los controles.

Técnicas Inmunológicas	CA	SHAM	RI50	BG	GV
Masa Beta	=	=	↑ [*]	≈ [↑]	=
Células/Área	=	=	=	↑ [*]	↑ [*]
Proliferación	=	=	↑ [*]	↑ [*]	↓ [*]
Neogénesis	=	=	=	↑	=
Apoptosis	=	=	≈ _↓	≈ _↓	≈ _↓

Tabla 6. Resumen de las técnicas inmunohistoquímicas realizadas en este estudio a las doce semanas tras la cirugía en los distintos grupos (* Estadísticamente significativo, ↑-↓, Tendencia estadística).

DISCUSIÓN

Hasta no hace mucho tiempo la técnica “gold standard” en CB ha sido el BG. Actualmente le está ganando terreno otra técnica, la GV [134].

Es sabido de la importante mejoría de la DM2 tras la CB, si bien la diferencia porcentual en la tasa de éxito entre las diversas técnicas es pequeña. Los motivos exactos de estas pequeñas diferencias cuando la intervención se produce a distintos niveles del tubo digestivo son poco conocidos, aun cuando el resultado es el mismo: una reversión de la DM2 a largo plazo.

A. CONSECUENCIAS SOBRE LA INGESTA Y EL INCREMENTO DE PESO

Los pacientes que se intervienen de alguna técnica de CB para perder peso poseen una serie de características psicoemocionales comunes: aceptan un seguimiento previo a la cirugía, con controles periódicos y con el compromiso de un cambio conductual mediante terapia psicológica y educativa [135]. Existen, por tanto, diferentes factores además de la cirugía, que producen un descenso en la ingesta y la pérdida de peso. Entre ellos se encuentran la actitud y aptitud del propio paciente. La remisión de la diabetes sólo se explica parcialmente a través de estos cambios junto a los mecanismos neurohormonales, aunque muchos de ellos aún son desconocidos [89, 106, 129, 136].

A diferencia del humano, en roedores y animales de experimentación el factor que va a influir en los cambios de ingesta y peso serán la cirugía junto a las modificaciones llevadas a cabo por el investigador sobre el roedor. En nuestro estudio no ha existido restricción de pienso, la cantidad de alimento ingerido tan sólo ha dependido de la sensación de saciedad. El animal *per se*, a diferencia del humano, no va a jugar ningún papel activo [5]. Estos animales no poseen obviamente los condicionantes culturales, sociales, biopsicológicos u organolépticos que rodean la ingesta de alimentos en la especie humana.

En nuestro trabajo la cirugía realizada, tanto en el grupo control quirúrgico como en los tres grupos quirúrgicos (RI50, BG y GV), ha provocado una disminución tanto de la ingesta de pienso como de peso durante los primeros siete-diez días postoperatorios (Figura 88 y 89). Todo esto posiblemente como consecuencia del estrés generado en el acto perioperatorio, fenómeno descrito en la bibliografía publicada [137-139].

En este sentido el **grupo S**, tras el postoperatorio inmediato presentó un comportamiento tanto en la ingesta como en el decremento de peso idéntico al grupo CA (Figura 88 y 89). Es por ello, que podemos afirmar que los cambios que estén relacionados

con la ingesta y el decremento ponderal a partir de este momento deben ser secundarios a la cirugía sobre el tubo digestivo. Los efectos de una intervención mínima sobre el tubo parecen solo tener un efecto estresante sobre el animal que perdura no más de una semana. Efectos más acentuados han de atribuirse a las maniobras más agresivas sobre el aparato digestivo.

En el caso particular del **grupo BG**, los valores observados para la ingesta así como para el incremento ponderal, se equiparan a los grupos controles a partir de la segunda-tercera semana tras la cirugía (Figura 56, 57, 88 y 89).

Estudios publicados tras BG en ratas obesas, muestran una ingesta disminuida las primeras semanas, que se equipara tras este período [104, 139-141]. El peso, al igual que ocurre en los humanos [89], sufre un descenso [104, 139-141].

En nuestro modelo, no obeso ni diabético, la pérdida de peso solo aparece, al igual que en el grupo S, en el postoperatorio. Este cambio en el peso no presenta diferencias con los grupos controles durante las 11 semanas restantes de supervivencia. Este comportamiento coincide con lo descrito en trabajos previos [142].

En nuestro trabajo hemos podido observar tras el sacrificio de los roedores intervenidos con BG como el tamaño el rumen gástrico aumentaba de manera ostensible en relación a su situación basal. Este hallazgo puede explicar, al menos parcialmente, que la capacidad en la ingesta se equipare a la de los animales de los grupos controles. Otra posible explicación a este fenómeno podría ser, que debido al volumen gástrico limitado tras la intervención, la rata haya aumentado el número de ingestas [104, 139].

Las propias limitaciones del acto técnico de realización del BG es un factor que influye en la cantidad de alimentos ingeridos en las ratas. La técnica estándar, y adoptada por nosotros, es preservar el rumen completo que irá conectado al asa alimentaria. Este remanente, supone alrededor de un tercio de todo el estómago del roedor. Mientras que en el humano solo se incluye una pequeña porción de fundus, apenas un 5% del total. La diferencia de volumen gástrico puede suponer un motivo adicional para entender la diferencia, al menos inicial, en la ingesta y el peso entre las ratas y el humano.

En el caso del peso de los animales estudiados, a excepción de algún trabajo previo [142], la mayor parte de los autores mantienen unos datos ponderales absolutos en los animales siempre inferiores a los nuestros. Tal vez debido a que las ratas estudiadas por estos autores parten de unas condiciones basales muy diferentes (ratas obesas y envejecidas-

48 semanas o superiores-, con pesos que oscilan entre 500-600 gr) y por tanto difícilmente comparables con nuestro estudio [104, 139].

Es necesario destacar que el gasto calórico-metabólico en ratas obesas tras la cirugía de BG se encuentra aumentado [104, 139] tanto a corto como largo plazo justificando igualmente el descenso de peso. En nuestro estudio si bien este parámetro no se ha cuantificado, no parece que su elevación sea suficiente para provocar un descenso de peso en los animales intervenidos de BG superior al de los controles. Por tanto, tras la realización de BG en modelo de rata Wistar no obesas, se producen cambios adaptativos en las primeras semanas que dan lugar a una ingesta y un peso equiparable a los grupos controles.

En el caso del **grupo RI50**, que presenta el estómago íntegro, la ingesta se equipara a la de los grupos controles, transcurridos los primeros quince días desde la intervención (Figura 39 y 88). Esto debe ser debido a que la resección intestinal no provoca modificaciones en la capacidad de ingesta. El descenso del peso, al inicio puede ser achacable a fenómenos derivados del período perioperatorio. Por otro lado, y a pesar de ser similar la ingesta entre el grupo RI50 y los controles a partir de la tercera semana, el incremento ponderal de peso se encuentra disminuido con diferencias estadísticamente significativas durante todo el seguimiento hasta las 11 semanas (Figura 40 y 89).

Son escasos los trabajos realizados en modelos animales con este tipo de cirugía, si bien cabe destacar alguno que de igual manera describe una disminución de la ingesta con pérdida del peso. Aunque sólo cuantificaba las dos primeras semanas [143]. A diferencia del nuestro, que monitoriza la ingesta durante 28 días y el peso durante 11 semanas tras la cirugía.

Existen algunas discordancias también entre nuestros datos y aquellos derivados de los trabajos de algunos autores. Caso de Duan, J., et al [137], que no presentan diferencias ni en la ingesta ni en el peso, entre controles y animales intervenidos con esta cirugía. Si bien es verdad que el estudio se desarrolla en un modelo de ratas obesas y DM2 a diferencia del nuestro.

Los motivos por el que nuestros animales a estudio poseen un incremento ponderal menor a los controles requieran de un estudio específico. Posiblemente lo fundamental sería medir el componente malabsortivo además de cuantificar el metabolismo basal, gasto calórico-metabólico (número y cantidad de ingestas) y distribución de la ingesta a lo largo de las 24 h (día/noche).

Actualmente no aparecen en la literatura estudios controlados de ingesta y peso tras resecciones intestinales en humanos que preserven las porciones inicial y distal del intestino delgado que remede al modelo RI50. Esto es debido a que las resecciones de intestino delgado suelen darse a nivel distal (enfermedad de Crohn, resecciones segmentarias por bridas, divertículo de Meckel, etc). Las resecciones más proximales son poco frecuentes, englobando, según la noxa, a uno o ambos segmentos (isquemia masiva, embolismo vasculares segmentarios, hernias/eventraciones de pared abdominales que requieren extirpación, etc). Se han descrito publicaciones con resecciones intestinales masivas, que aunque engloban en algunos de los casos solo yeyuno también incluyen pacientes con extirpación parcial de íleon. Son estudios de serie de casos que no recogen los parámetros de resección intestinal buscados [144, 145].

El **grupo GV** mantuvo una ingesta disminuida respecto a la de los grupos controles estadísticamente significativos, así como un incremento inferior de peso respecto a los controles estadísticamente significativo durante las 11 semanas (Figura 72,73,88 y 89).

Algunos estudios previos muestran que tras la GV en ratas obesas se produce un incremento de peso inferior al de los grupos controles [146, 147], al igual que en ratas no obesas [148-150]. Estos resultados se correlacionan con una ingesta menor, tanto en ratas obesas como en normopesas, aunque esta disminución de la ingesta varía según el estudio en tiempo entre los catorce días [149], varias semanas [148] y hasta cinco meses [151].

Al igual que hemos encontrado disminución de ambos parámetros en ratas obesas, se han descrito los mismos resultados en modelo de ratas GK y no obesas [151] y de manera independiente del tipo de alimentación suministrada (dieta normo o hipercalórica) [138].

Por tanto para el modelo de GV en animales, tanto sanos como obesos y/o con DM2, parece muy homogéneo en relación a estos dos parámetros.

La pérdida de peso, como ya hemos comentado, no se justifica tan sólo por el descenso en la ingesta. Influyen además mecanismos neurohormonales [146, 152, 153]. Un factor que en humanos es importante de cara a la tasa de pérdida de peso tras la cirugía es el diámetro del tubular gástrico medido con una sonda de Faucher [154]. En roedores el volumen del remanente gástrico solo se considera la zona de sección y el material utilizado en dicha sección [147, 150]. Esto puede provocar la variabilidad en tiempo e intensidad de los datos objetivados.

No conocemos la existencia de algún artículo que valoren las diferencias de ingesta y peso de las tres variantes de CB incluidas en nuestro estudio. Es más, pocos artículos son

los que comparan los efectos de BG y GV a este respecto. Un solo estudio en modelos de roedores sanos muestra un incremento inferior de peso de ambos tipos de cirugía tras la intervención respecto a sus controles. El BG, en este caso, posee un incremento ponderal inferior al grupo GV [152]. Otros estudios en modelos de ratas obesas (Long-Evans) no encuentran diferencias ni en la ingesta ni en el incremento de peso entre BG y GV a lo largo de un seguimiento a 17 y 28 semanas, aunque son inferiores en ambos parámetros al grupo S [155, 156].

En *resumen* nuestros resultados tanto en ingesta como en incremento de peso tras las distintas cirugías no difieren de manera reseñable de los modelos observados en la literatura. Las mayores discrepancias han aflorado como consecuencia de la comparación con modelos de ratas obesas y/o diabéticas, situación lógica por otra parte a consecuencia de la introducción de sesgos que puedan enmascarar los cambios fisiológicos tras la CB.

Nos llama poderosamente la atención el comportamiento del grupo BG de nuestro estudio en comparación a sus homónimos en la literatura, al no presentar una pérdida importante de peso tras la cirugía. Esta pérdida de peso e ingesta era esperada, al igual que ha ocurrido en el modelo GV y RI50.

Los resultados obtenidos en animales que han sufrido RI50 en relación a datos de ingesta y peso se encuentran “a caballo” entre los obtenidos en los casos de BG y GV. La exéresis de un segmento largo de intestino delgado puede justificar la disminución de la absorción de nutrientes y con ello un incremento menor de peso a lo largo de las 11 semanas de estudio.

No hace falta resaltar que éticamente no se pueden realizar técnicas de CB en humanos sanos. Con los datos expuestos podríamos plantearnos que los resultados de ingesta e incremento de peso, como han sucedido en modelos de roedores sanos, pueden ser diferentes a los esquemas esperables por la experiencia actual. En cualquiera de estos casos, las diferencias observadas, aunque puedan ser menores a las esperadas, no dejan de validar el propio proceso quirúrgico.

Las técnicas vienen a desencadenar serias repercusiones funcionales en los animales, de forma que el peso de las mismas no es sino el reflejo de esa alteración.

B. DE LAS PRUEBAS FUNCIONALES REALIZADAS

B.1. Glucemia

Nuestro estudio no muestra diferencias estadísticas en los cinco grupos en cuanto a las glucemias (Figura 90).

Los escasos estudios relacionados que valoran este factor en ratas sanas no obesas muestran resultados superponibles a los nuestros. Como sucede en un trabajo donde se monitorizaron las glucemias de los animales tras RI50, otro tras BG, y un tercero tras GV a las dos, cuatro semanas y veintiún días respectivamente sin diferencias con los controles [142, 143, 149]. En ningún caso durante un periodo largo de 11 semanas como es nuestro caso.

En *resumen*, parece que al tratarse de animales sanos no obesos los utilizados en este estudio, y al encontrarse íntegros los diferentes mecanismos encargados de la regulación de la glucemia, estos son capaces de mantener las cifras en rango de normalidad. A pesar del cambio conformacional del tubo digestivo, la homeostasis del metabolismo glucémico parece mantenerse en un nuevo equilibrio. Se puede afirmar que la CB en ratas sanas, no provoca cambios en sus glucemias.

B.2. Frente al test de tolerancia intraperitoneal de glucosa (TTIPG)

CA Y S

En primer lugar en nuestro estudio, observamos que las curvas obtenidas en el TTIPG para el grupo S (intragrupo) no son equiparables en la cuarta y la octava semana (Figura 42B). A pesar de no objetivarse diferencias estadísticamente significativas si aparecen diferencias perceptibles. La semana doce en el grupo S no ofrece estas diferencias con el CA (Figura 44C). El comportamiento del grupo CA en las tres mediciones realizadas no arrojan diferencias (Figura 42A).

Las diferencias no significativas entre las curvas correspondientes a los TTIPG de ambos grupos, S y CA, obtenidas en nuestro trabajo (Figura 44 y 45), únicamente parecen ser atribuibles al estrés quirúrgico que sucede en el grupo S. Ya algunos autores como Salinari, et al [143] comentan acerca de un área bajo la curva (ABC) del grupo S más elevada y estadísticamente significativa respecto a CA. Si bien en este estudio el test de tolerancia de glucosa fue oral, y el nuestro intraperitoneal, refleja una evolución de tan sólo dos semanas desde la cirugía. En este sentido el estrés quirúrgico parece ser la causa más

fiable, ya que el único procedimiento que sufre el animal es la laparotomía con una sección y reanastomosis de intestino delgado.

Además, y salvando las distancias con nuestro modelo, estudios en ratas obesas mediante dieta hipercalórica (ratas Sprague-Dawley) y en un modelo de DM2 comparando dos grupos controles (S y CA), tras el TTIPG a la séptima semana postquirúrgica el grupo S presenta un ABC estadísticamente significativo mayor que el resto de los grupos, incluido el CA [146]. Esto refrenda nuestra hipótesis de que el estrés pudiese perdurar al menos hasta la séptima semana como ocurre en este estudio y hasta la octava como es el nuestro. Bien es verdad, que incluso en ese estudio existen diferencias estadísticamente significativas y en el nuestro solo existe una tendencia.

Un motivo para justificar esta diferencia pudiese ser la situación patológica o iatrogénica de las ratas, obesas y diabéticas, en las cuales la asociación del estrés quizás haya potenciado la intolerancia tras el test. En contraposición a esto último y nuevamente salvando las distancias entre nuestros modelos y técnicas, algunos autores muestran un aumento del ABC (TTOG) del grupo S intragrupo a los 45 días postoperatorios (tras una simple laparotomía, sin entero ni gastrotomía) aunque sin existir diferencias estadísticamente significativas [157].

Este aparente contrasentido entorno a los resultados de los TTIPG en controles y animales problema podría ser planteado como una interesante línea a seguir en futuros estudios. No hemos de olvidar que esta homeostasis se alcanza con un delicado equilibrio entre distintos participantes. En nuestro estudio incluimos el páncreas y la absorción de nutrientes tras las cirugías realizadas en el tubo digestivo. Sin embargo, hay otro grupo de tejidos que tienen una importancia fundamental en la homeostasis de la glucemia, como son los tejidos periféricos. Estos no son objeto de nuestro estudio, pero pueden tener cierto papel en la explicación de las aparentes diferencias de respuesta a una sobrecarga de glucosa.

BG

No hemos encontrado en la literatura ningún artículo que realice test de tolerancia intraperitoneal ni oral de glucosa tras la realización de BG en ratas sanas. En diversos estudios tras BG en ratas obesas y/o DM2 mejora el ABC tras el test [156, 158].

En el caso de los TTIPG realizados sobre nuestros animales tras el BG muestran un patrón muy parecido al que desarrollan el grupo RI50 (Figura 44, 45, 91 y 92), alcanzando significación estadística (ABC) a partir del segundo test (ocho semanas) (Figura 60, 61, 91 y 92). El motivo por el que la intolerancia aparece al menos pasadas las primeras cuatro

semanas podría ser entendido si pensamos que es el tiempo necesario para que en un roedor sano y tras la cirugía se produzcan los fenómenos biológicos para originar este evento. Salinari et al [143], sin embargo, ha publicado que tras realizar resecciones del 50 % del yeyuno objetiva intolerancias estadísticamente significativas con respecto a los controles de manera muy temprana. En nuestro estudio esta observación no se corrobora, quizás por la potencia estadística, o bien porque estos autores realizan una sobrecarga oral, mientras en nuestro caso la vía utilizada fue la intraperitoneal.

Otros parámetros interesantes a cuantificar de forma temprana tras la cirugía son, por ejemplo, los niveles de enterohormonas, la sensibilidad a la insulina, etc, que nos permitirán disipar algunas dudas en relación a este punto en futuras experiencias.

Los test de sobrecargas en humanos objetivan una mejoría de la sensibilidad a la glucosa tras CB en obesos y diabéticos [159], así como en obesos no diabéticos [160, 161]. Incluso en DM2 tras técnicas derivativas realizadas para el tratamiento del cáncer gástrico [162, 163]. Podríamos sugerir como hipótesis, que al igual que en los animales de experimentación de nuestro estudio, si se realizasen BG en humanos no diabéticos y normopesos, obtendríamos resultados similares.

RI50

En nuestro estudio tras realizar la RI50 se produce una intolerancia manifiesta con diferencias estadísticamente significativas en las ABC respecto a los controles, que comienza a partir de la octava semana y que perdura al menos hasta el final del estudio (Figura 44,45, 91 y 92). Los datos aportados en especies animales patológicas [137] apoyan que la extirpación yeyunal provoca una disminución de la intolerancia glucémica. En especies sanas, tanto en ratas [143, 164] como perros [165], inducen a pensar que deben de emitirse estímulos que provocan una intolerancia glucémica inicial. El sentido de este fenómeno podría ser mandar dichas señales químicas al páncreas, entre otros lugares, que condujesen a la normalización a posteriori de los parámetros glucídicos. Abordaremos más adelante dichos mecanismos.

Son escasos los estudios que refieren TTIPG en modelos de roedor. Además los que existen en su mayoría son en modelos obesos y/o diabéticos. Para una mayor dificultad en la interpretación de los datos, no todos los test son intraperitoneales, y algunos son realizados vía oral [137, 143, 164].

Apoyando, al menos parcialmente nuestros resultados, encontramos alguna referencia. Un artículo donde se realiza un TTOG a las dos semanas tras yeyunectomía

(RI50), muestra de igual manera a la nuestra un ABC más elevada que el CA. Sin embargo, en este mismo estudio el ABC del grupo S fue más elevado que el grupo tras yeyunectomía [143]. Es coherente afirmar que el estrés sea un factor condicionante, pero es ineludible igualmente afirmar que a los quince días pueden estar ocurriendo otras señales que contrarresten el estrés y que provoquen un ABC inferior en el grupo tras la yeyunectomía (RI50) en relación al grupo S.

En la misma línea de ratas Wistar sanas se publicó otro trabajo en el cual tras la yeyunectomía se produjo una intolerancia glucídica (TTIPG) a los 28 días. Curiosamente este fenómeno no se produjo en el mismo estudio tras resección del íleon [164]. En contraposición, Salinari et al [143], mostraba un ABC del grupo tras yeyunectomía inferior al grupo tras resección ileal. No obstante una explicación a estas diferencias podrían ser; el momento cronológico y la vía utilizada para la realización del test; uno a las dos semanas (TTOG) y el previo a las cuatro (TTIPG).

En la vertiente patológica, en ratas obesas y con DM2, tras la yeyunectomía (RI50) se ha objetivado en la bibliografía un ABC (TTOG) menor en el grupo quirúrgico a las 4 y 12 semanas [137]. Este último resultado muestra la mejoría que supone la extirpación del yeyuno en ratas patológicas en relación a la sensibilidad glucémica.

Por último en otras especies también se ha referido esta alteración de la sensibilidad de la glucosa, más concretamente en perros. Tras la resección del yeyuno se produce una elevación de las glucemias en las curvas tras el test de tolerancia intravenosa (TTIVG) de glucosa, a las 3 semanas y 3 meses. No ocurre lo mismo con el grupo al que se le realizó la resección del íleon, en los que se produjo la normalización de los valores glucémicos a las 3 meses, tras el mismo test [165].

En humanos, los estudios son casi ausentes. Si bien se ha referido en una serie de casos que a los 4-5 semanas tras resección de intestino proximal (yeyuno), se produce una elevación de glucosa por encima del grupo control, a la hora y las dos horas tras la administración de 50 gr de glucosa v.o. No obstante tras la administración de 25 gr. de glucosa i.v. no existen diferencias entre ambos grupos [144]. Otro trabajo mezcla resecciones de yeyuno e íleon, realizando dos sobrecargas, una precoz (al mes) y otra tardía (tres meses), obteniendo cifras de glucemias tras TTOG con una tendencia superior en los dos test [145]. En este sentido no podemos sacar conclusiones tras la revisión de los estudios realizados en humanos, al ser una serie de casos clínicos con resecciones no estandarizadas. Vistos en su conjunto los resultados relativos a los test de sobrecarga glucídica parecen

asemejarse a lo que sucede en las ratas Wistar tras RI50, con una tendencia a la intolerancia glucídica.

GV

Nuevamente la bibliografía relativa a estudios de tolerancia glucídica en modelos animales sanos tras la realización de GV son prácticamente inexistentes. En nuestra experiencia no observamos diferencias significativas en la evolución temporal de cada grupo quirúrgico. En el grupo S las curvas a las cuatro y ocho semanas no son equiparables a las del grupo CA. Ambos grupos, S y GV, son similares en su comportamiento en los tres test (Figura 76 y 91). El ABC de los tres grupos no muestra diferencias estadísticamente significativas (Figura 77 y 92).

A diferencia de los estudios en modelos patológicos, ya sea en ratas obesas [151], diabéticas (DM2) [151] o la combinación de ambas [146, 166], donde el ABC disminuye de forma significativa con una mejoría en la sensibilidad a la glucosa.

Otro tanto parece ocurrir en humanos ya que tras practicar una GV se observa una mejoría de los parámetros glucídicos, tanto en pacientes diabéticos obesos con IMC superior a 35 [167], como aquellos que poseen un IMC inferiores a dicha cifra [117].

Así pues, la GV en roedores sanos no obesos no provoca alteraciones en los TTIPG, a diferencia del RI50 y del BG. Es por ello que debemos suponer que los resultados que hemos obtenido a nivel inmunohistoquímico en los páncreas han sido provocados por mecanismos, al menos diferentes, a los que sustentan al BG y RI50. Otra posibilidad es que, en el supuesto de que los mecanismos de los tres grupos sean los mismos a nivel pancreático, la GV no tenga el efecto adicional de producir intolerancia glucídica. Recordemos que esta técnica actúa exclusivamente en el estómago; las demás como denominador común lo hacen en el intestino delgado, con mayor o menor repercusión sobre el mismo.

Otro punto interesante en este estudio sería determinar el grado de implicación de componentes externos u otros mecanismos en el resultado de estos tests. Como ejemplo tenemos la posible influencia del estrés tras la cirugía y sus resultados o el papel de los tejidos periféricos.

B.2.1. Resumen de TTIPG-ABC de todos los grupos

Tras el análisis de los resultados de los TTIPG quizás la cuestión más relevante sería, *¿por qué los tests de sobrecarga en animales sanos muestran una intolerancia*

glucémica temporal?, y la segunda pregunta, *¿a qué se debe que no se produzca este fenómeno en los animales sometidos a una intervención con técnica restrictiva pura?*.

La primera pregunta requiere del análisis de varios apartados.

a) Hay que recordar que el BG y el RI50 poseen características comunes; el contacto precoz de los alimentos con el íleon y una disminución del tránsito de los mismos a través del yeyuno. Esto puede ser debido por el puenteo que implica una superficie de contacto acortada con el yeyuno en el caso del BG (40-50%), o bien por la resección del yeyuno, quedando alrededor del 10-20% del mismo en el RI50.

b) En estudios previos la preservación del yeyuno y el paso de los nutrientes a través del mismo con resección del íleon parece sostener las señales locales. Y esto no provocaría variaciones de los niveles glucémicos con respecto a los controles. Este fenómeno fue demostrado ya tras la realización de TTIPG en ratas Wistar sanas a los 28 días [164] y en TTIVG en perros sanos a los tres meses [165]. En el caso de ratas Wistar tras la realización de TTOG a las dos semanas de someterlas a una resección ileal, el ABC obtenido fue similar al grupo S [143]. Mientras que el ABC del grupo CA en éste mismo estudio fue inferior. Hay que ser cautelosos con el resultado de este último estudio. Teóricamente CA y S deberían poseer los mismos resultados y además ser equiparables al grupo de resección ileal. Existen dos circunstancias a tener en cuenta que pueden explicar los resultados:

- Por un lado el TTOG se realiza tan solo dos semanas después de la cirugía y los estudios previos en este sentido son más tardíos (un mes en el caso de las ratas Wistar y a los tres meses el de los caninos).
- En segundo lugar los grupos controles en los tests previos poseen valores similares, mientras que en este último estudio hallamos diferencias estadísticamente significativas entre CA y S. Por tanto hay que tener presente que el estrés tras la cirugía es un factor a tener en cuenta.

c) El paso de los alimentos directamente a íleon, por resección de un segmento importante de yeyuno (al mes en ratas Wistar [164] y en perros a las 3 semanas [165]), objetivado en los TTIPG y TTIVG respectivamente), muestran unos niveles glucémicos más elevados que los controles.

En humanos, prácticamente no se han realizado estudios que comprendan tests de tolerancia tras sufrir una resección intestinal. Únicamente hemos encontrado un artículo en que se cuantifican niveles glucémicos y de TTIVG equiparables al de los controles en

sujetos en que se realizan resecciones amplias, mayoritariamente yeyunales, y a las 4-5 semanas tras la cirugía [144]. En este mismo trabajo, tras practicar TTOG con medición de dos cifras puntuales de glucemia (no se realiza curva de tolerancia), en el grupo intervenido y grupo control se obtienen cifras de glucosa más elevadas en el primero de manera significativa.

No hemos encontrado publicaciones en las que se valoren los resultados de tests de tolerancia glucémica tras BG en modelos animales sanos. La similitud, por tanto, de nuestros resultados tras TTIPG en los grupos sometidos a RI50 y BG (Figura 91) la justificamos dadas las similitudes que ofrecen ambos modelos al paso característico de los alimentos a través del yeyuno e íleon: acortado en el primero y temprano en el segundo.

La intolerancia glucémica de la que hablamos parece comenzar de manera precoz, tan sólo diez días tras la cirugía a juzgar por algunos estudios (ratas Wistar no obesas) [143] o al mes [164]. Sin embargo, en nuestro trabajo la intolerancia ocurre de manera estadísticamente significativo a partir del segundo mes, y se prolonga al menos hasta el tercer mes en el caso del RI50, al igual que tras la yeyunectomía en perros [165].

En *resumen y respondiendo a la primera pregunta*, podemos afirmar que, a tenor de nuestros datos y en concordancia con los artículos comentados, el cambio conformacional del tubo digestivo produce, en los casos en que el alimento durante su digestión tenga escaso contacto con el yeyuno (RI50 y BG), una intolerancia glucémica reactiva que se prolonga, al menos hasta los tres meses (duración de nuestro estudio). Esto debe suceder por la alteración de las señales químicas que se sintetizan y liberan en el yeyuno. Estas sustancias van a ser uno de los múltiples artífices encargados de mantener la homeostasis de la glucosa.

En relación a la segunda pregunta a responder: *¿a qué se debe que no se produzca la intolerancia glucémica en la técnica restrictiva pura?*

Podemos decir que la actuación realizada sobre el estómago tras la GV parece no poseer capacidad para provocar cambios glucémicos en los tests de tolerancia. Dicho de otra manera, el mantenimiento de la integridad de los tres segmentos de intestino delgado, así como el paso de nutrientes a través de su recorrido fisiológico, mantendría las señales necesarias para no alterar el metabolismo hidrocarbonado. En otro epígrafe aportamos datos que muestran otros mecanismos de acción de la GV a nivel pancreático (estudio inmunohistoquímico de los páncreas) (Figura 80 y 81).

Otra cuestión interesante a analizar sería; *¿por qué el grupo RI50 y el BG poseen un comportamiento similar de intolerancia a las ocho semanas tras la intervención y sin embargo a las doce semanas el grupo intervenido con BG pierde esas diferencias, mientras que los animales de grupo sometido a RI50 la mantienen, no sólo respecto al CA, sino incluso al grupo S?*

Tras la justificación de la intolerancia glucídica, la capacidad de recuperación de la tolerancia a la insulina en los tejidos periféricos de los animales sometidos a RI50, a diferencia del BG, puede ser entendida por los motivos que se comentan a continuación:

a) En primer lugar, la menor cantidad de yeyuno remanente en el grupo sometido a RI50 (10-20% del total) podría justificar, como en la bibliografía consultada [143, 144, 164, 165], que los mediadores químicos que provengan del yeyuno den lugar a una disminución de los estímulos al páncreas para sus ciclos normales de renovación celular. Se generaría lo que Katsuhiko Tamura et al [165] llamó “Enterogenic Chemical Diabetes”. El BG, por contra, al poseer mayor segmento de yeyuno funcional (40-50 % del total) mantendría esa capacidad de estímulo desde el yeyuno remanente. Y consecuentemente mayor capacidad para revertir la intolerancia ocurrida tras la cirugía. Esto viene corroborado por el hecho de que el grupo sometido a RI50 mantiene esta intolerancia, sin capacidad aún para revertirla, hasta la finalización de nuestro estudio. No sabemos qué ocurriría en periodos de mayor supervivencia.

b) De otra parte el contacto temprano del alimento a nivel del íleon (teoría del intestino distal), es propuesto como responsable de un estímulo adicional en la liberación de enterohormonas (GLP-1 y otras) [168]. Provocando un efecto de estimulación sobre la páncreas [51]. Ambos modelos, RI50 y BG, ofrecen resultados que cumplen con esta propuesta en mayor o menor medida. Estudios previos, al menos en ratas sanas tras BG, han demostrado, que existe un aumento de la secreción de GLP-1 tras la cirugía [142].

Según la conocida como teoría del intestino proximal, en ratas diabéticas, la ausencia de paso de alimentos a través del duodeno mejoraría el balance entre el efecto incretina (GIP-células K) y el efecto anti-incretina [124] y con ello la homeostasis glucémica en estos animales. En nuestro estudio el paso del bolo alimenticio a través del duodeno se mantiene en el grupo RI50, y según la teoría del intestino proximal este paso de alimentos podría provocar una prolongación de la intolerancia en relación a la mostrada por los animales del grupo sometido a BG. Así la exclusión duodenal, como es el caso del BG, propiciaría que los valores de las curvas de los TTIPG tras doce semanas de intervención pierdan significación estadística gracias, al menos en parte, a las enterohormonas

sintetizadas desde el duodeno. Estas hormonas comenzarían a revertir el desequilibrio homeostático generado tras la cirugía. Estos últimos mecanismos, hasta la finalización de nuestro estudio, no parecen haberse puesto en marcha en los animales del grupo con RI50.

Podemos **concluir** a tenor de nuestros datos que el paso de los alimentos por el duodeno, probablemente junto a otros factores, impide o retrasa la reversión de la resistencia glucémica tras TTIPG, como parece ocurrir en el grupo RI50.

B.3. Insulinemia Basal

Fue estudiada a las 4 y 12 semanas tras las intervenciones en los cinco grupos. No hubo diferencias significativas en la insulinemias basales a las cuatro semanas tras la intervención entre los grupos quirúrgicos RI50 y GV y los controles (Figura 46 y 78). El grupo BG mostró unas cifras elevadas estadísticamente significativas respecto a los controles (Figura 62). Cabe destacar que el grupo GV si bien mostró una tendencia a estar aumentada, esta no marcó diferencias estadísticas respecto a los controles en ningún caso, (Figura 78).

Respecto al análisis realizado a las doce semanas, comentar que las cifras basales de insulina en los cinco grupos fueron totalmente equiparables (Figura 93).

RI50

Nuestros resultados (Figura 46), al igual que lo publicado en los trabajos previos en animales sanos, con resecciones intestinales similares, parecen no aportar diferencias sustanciales. Caso de Tamura, et al [165] que tras realizar estudios con perros, no halló diferencias en los niveles basales de insulina, ni a las 3 semanas ni a los 3 meses tras ésta técnica. En modelos patológicos, este tipo de intervenciones bariátricas en ratas obesas y diabéticas tampoco parecen modificar los niveles basales de insulina [157].

Otro tanto ocurre con técnicas parecidas, by-pass extenso [169] o resección del 95 % del intestino [170], en los cuales la insulinemia basal igualmente no ofrece cambios respecto a los controles. Esta situación se repite también en humanos, tras resección intestinal de segmentos tanto yeyunales como ileales (mezclados en el mismo estudio) [144, 145].

En conclusión la insulina basal no se modifica tras la yeyunectomía e incluso tras resecciones de íleon. Más aún, la exéresis masiva de ambos segmentos tampoco parece modificar sus niveles basales. Sin embargo, si se ha observado que en grupos de animales

sometidos a resecciones yeyunales tras TTOG [143] y TTIV [165], y humanos tras TTOG [145], las curvas de insulina se encuentran por debajo de las referidas por los controles. El intestino, por tanto, parece que como órgano una vez resecado, deja de emitir señales al páncreas provocando la consecuente incapacidad de este para responder de manera adecuada a la situación de sobrecarga generada por los tests de tolerancia. Esta incapacidad podría provocar, como veremos más adelante, cambios en la población celular beta para adaptarse a esta nueva situación. Estos cambios se han observado en ratas obesas y diabéticas en las que se objetiva una mejoría estadísticamente significativa en el TTOG y de la sensibilidad insulínica [137].

BG

En nuestro estudio los animales sometidos a BG muestran niveles basales elevados de insulina a las cuatro semanas de la intervención respecto a los animales control. Dicha situación ha sido descrita por autores como Yu, et al [142] en el mismo modelo quirúrgico. Nosotros además aportamos datos basales tras doce semanas de la intervención, sin que aparezcan diferencias con los controles (Figura 62).

En el caso de animales con DM2 (GK), los estudios muestran discordancia. Desde niveles de insulina basales previos a la cirugía elevadas [158] o iguales [171], a grupos quirúrgicos (GK) y control (ratas Wistar) que se equiparan a la cuarta semana de supervivencia tras la cirugía. Igualmente sucede en modelos de ratas obesas no DM2 que poseyendo unos niveles basales inferiores a los controles, a los 5 meses la insulinemia basal se equipara en los dos grupos [156].

Por último, trabajos realizados en humanos tras la realización de BG muestran la existencia de un descenso de la insulinemia tanto en pacientes obesos como diabéticos, así como en obesos con tolerancia normal a la glucosa [160, 161].

Queda patente que en el caso del BG realizado en modelos patológicos este provoca un descenso de la insulina basal. Sin embargo en ratas sanas, como han demostrado algunos autores [142] y nuestro estudio, parece existir una elevación de sus niveles de insulina a las cuatro semanas de la intervención. Con una posterior normalización a las doce semanas de la misma. Los otros dos modelos, tanto la RI50 como la GV, no presentan diferencias en este sentido con los controles.

La diferencia quirúrgica del modelo BG y los otros dos grupos (RI50 y GV) es la actuación quirúrgica mixta: con preservación del estómago y yeyuno aunque ambos parcialmente excluidos. Es por tanto aquí donde debe residir la clave. Bien en la

preservación de parte del estómago pero con exclusión duodeno-yeyuno proximal al paso de los nutrientes. Bien en la sinergia de péptidos hormonales que al actuar en dos niveles (estómago e intestino proximal) se vean alterados en su síntesis y liberación. Proponemos que esta elevación basal de la insulinemia es secundaria a señales originadas inicialmente en el intestino y que quizás sean mantenidas por el tejido periférico, posiblemente por un incremento de la resistencia insulínica.

GV

Al igual que el grupo RI50, los niveles basales de insulina en los animales sometidos a GV en nuestro estudio no varían (Figura 78) respecto a los controles, ni a las cuatro ni a las doce semanas. Tal y como recogen algunos trabajos previos en animales sanos [149, 172]. No obstante parece existir cierta tendencia al incremento en la cuarta semana tras la cirugía, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Otro tanto ocurre en ratas GK diabéticas a los cinco meses tras el postoperatorio [151].

Esto no ocurre en el caso de ratas obesas tras practicarles una GV, en las cuales sí se observa un descenso de los niveles basales de insulina con respecto a controles según la literatura [151, 156]. Y al contrario que en los modelos animales diabéticos, en humanos obesos diabéticos tras someterlos a GV existe un descenso progresivo de la insulina basal desde la primera semana tras la intervención hasta la cincuenta y dos, con una remisión de la DM2 en un 50% de los pacientes [117].

La actuación a nivel gástrico en nuestro modelo no parece provocar cambios basales en la secreción de insulina en concordancia con lo descrito hasta ahora.

En *resumen* y según nuestra experiencia, la insulinemia basal no sufre modificaciones salvo en el grupo de animales sometidos a BG. Es decir, la técnica mixta, esta doble actuación a diferente nivel del tubo digestivo, debe provocar posiblemente una sinergia de las señales fisiológicas que eleven los niveles basales de insulina. Otra explicación podría ser que la técnica de BG es la única de los tres modelos que obvia el paso a través del duodeno-yeyuno proximal. Debe ser esta particularidad de la técnica la causante de inducir señales hormonales que producen dicha insulinemia basal elevada. No obstante los tejidos periféricos se presentan también como un importante elemento a estudio a la hora de comprender en su totalidad esta elevada insulinemia basal

Otro aspecto interesante es la transitoriedad del evento. A las doce semanas no hay diferencias respecto a los grupos controles. Parece que los mecanismos son precoces, y los eventos acontecen en las primeras semanas tras la cirugía.

B.4. Test de resistencia insulínica (HOMA-IR)

Es importante resaltar en primer lugar que las glucemias de todos los grupos no ofrecen diferencias estadística y por ello los resultados de las insulinemias basales van a marcar los valores que hemos obtenido en el test HOMA-IR. La única variable que se modifica de manera significativa es la insulina basal y por tanto solo vamos a obtener un valor HOMA-IR elevado en el BG a las cuatro semanas (Figura 94).

En *resumen*, podemos afirmar que el aumento de la resistencia insulínica solo ocurre tras BG en nuestro modelo y de manera transitoria a las pocas semanas de la cirugía. Pensamos que a raíz de este tipo de cirugía deben ponerse en marcha señales enterohormonales de diversa índole, que provocan dicha resistencia a nivel periférico. Aquí se abre un importante campo para estudios futuros.

C. RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA POBLACIÓN CELULAR BETA PANCREÁTICA

C.1. Estudio del número de células beta en el islote pancreático

En nuestro estudio mostramos un aumento significativo del número de células beta por área de insulina positiva correspondiente a los islotes pancreáticos, en los grupos quirúrgicos sometidos a BG y GV. Esto ocurre a las doce semanas de la intervención (Figura 64 y 80) y no ha sido observado en el grupo de animales sometidos a RI50 (Figura 48).

Trabajos previos en ratas Wistar (como modelo de DM1 inducido con estreptozotocina intraperitoneal) tras realizarles un BG observaron a las 3 semanas de la cirugía que en el páncreas aparecían fenómenos compatibles con una hiperplasia de las células beta [173]. No obstante son casi inexistentes los estudios que hayan contemplado la hiperplasia en los islotes pancreáticos, en modelos patológicos o sanos, sometidos a BG, resecciones masivas intestinales o GV.

Dentro de la escasa bibliografía, algunos autores proponen la hiperplasia celular pancreática tras resección de intestino delgado (masiva y segmentaria) en ratas sanas [174, 175]. Aunque no aclaran si esto acontece en el tejido exocrino y/o endocrino.

En humanos se han publicado casos de nesidioblastosis tras BG, estos afirman la existencia de páncreas con hiperplasia de los islotes en relación a controles sanos [176].

En el caso de la GV no existen publicados casos clínicos con necesidad de extirpación parcial de páncreas en humanos. Es por esto, que incluso asumiendo que este mecanismo de hiperplasia éste presente, podemos pensar que no es lo suficientemente potente como para provocar síntomas de hipoglucemias importantes y/o mantenidas que obliguen a la extirpación parcial del páncreas. En modelos animales ningún grupo ha estudiado este parámetro biológico.

La hiperplasia, tras BG, está demostrada tanto en modelos patológicos de ratas como en humanos. Por ello es factible pensar que este mecanismo fisiológico esté presente tras la CB en alguna medida.

En los páncreas del grupo sometido a RI50 de nuestra línea experimental no se produce este fenómeno. En general poco se ha estudiado, como ya hemos comentado en este

sentido. El motivo quizás más importante, en este caso particular, sea la ausencia de su uso en humanos como técnica bariátrica.

Por último nos podemos preguntar el motivo por el cual la hiperplasia sólo lo objetivamos en BG y GV y no en el RI50. El nexo quirúrgico común de ambos grupos es la manipulación gástrica, con extirpación casi completa o exclusión al paso de alimentos. Quizás esté aquí la clave, dada por la presencia de alguna hormona de origen gástrico, que provoque el estímulo en el páncreas. Quedan por despejar los mecanismos responsables en futuros trabajos.

C.2. Estudio de la proliferación en las células beta pancreática

Como hemos presentado en el apartado de resultados la tasa de proliferación de la población de células beta observada en nuestros modelos quirúrgicos aparece elevada significativamente en RI50-BG (Figura 49 y 65) y disminuido en GV (Figura 81) con respecto a los correspondientes controles.

Este aspecto relativo al estudio de la capacidad de proliferación de la población de células beta tras la realización de algún tipo de CB es todavía un campo prácticamente inexplorado. Sólo un trabajo muestra que cuatro semanas tras BG en ratas Wistar no obesas [142], aparecen aumentos estadísticamente significativos de niveles de GLP-1 en relación a sus controles. Como es sabido, esta enterohormona favorece la proliferación de las células beta y la secreción de la insulina [168]. De manera indirecta podemos pensar que tras este estudio uno de los mecanismos de la proliferación en el páncreas, y por tanto apoyando nuestros resultados, sea la elevación de esta enterohormona.

También en otros estudios, en ratas sanas Sprague-Dawley, 14 días tras la realización de BG se estudiaron los niveles de GLP-2 y PYY, tanto en ayuno como postprandial. Estos autores encuentran elevados ambas hormonas con relación al grupo S [177]. Estas enterohormonas, al igual que el GLP-1, estimulan la proliferación y el mantenimiento de los islotes pancreáticos. Datos que avalan, junto a lo comentado en el párrafo previo, que en ratas sanas existen estímulos añadidos para la proliferación.

Es llamativo, aunque no contrapuesto al proceso proliferativo, el descenso de la ghrelina tras BG en este mismo modelo sano de Wistar. Esta enterohormona está relacionada en la modulación de la secreción de la insulina y en la homeostasis de la glucosa [178]. Es por esto, que quizás habría que tenerla en cuenta como enterohormona no solo en la GV, sino en otras técnicas como el BG. La ghrelina puede ser contribuyente a los cambios que se producen en la fisiología tras la realización del BG.

Pero no solo encontramos una elevación de enterohormonas en modelos sanos, tras la realización de cirugía bariátrica. También en ratas con DM2 (GK) a la tercera semana tras BG, los niveles de GLP-1 se equiparan al grupo control (Wistar no obesas en este caso), y en la cuarta semana ya son superiores sus niveles a los del grupo control. A la cuarta semana tras la cirugía, en este modelo la expresión de proteínas del receptor de GLP-1 se encuentra elevada. Es decir, no solo se estabiliza pronto el nivel sérico sino que aumenta con respecto a los controles. Además tras el uso de exendina-4 (análogo de GLP-1) se observa un aumento de marcadores de proliferación como ki-67, y una disminución de otros de apoptosis -como Bax y Caspasa 3- [158]. Por tanto no solo hay que valorar las enterohormonas y sus receptores, de forma similar es igualmente importante la expresión de marcadores directos de proliferación tal y como realizamos en nuestro trabajo.

La proliferación en el páncreas de las GV de nuestro estudio se encuentra descendida a las doce semanas. Podemos hipotetizar que estos datos son debidos a la caída del efecto del GLP-1 de forma fisiopatológica tras la GV. Además el efecto proliferativo podría ocurrir de manera más precoz que en los otros dos grupos de estudio, con un posterior descenso observado en nuestros resultados (Figura 81 y 96). Un artículo en ratas sanas (Sprague-Dawley) apunta hacia el aumento de células productoras de GLP-1 en íleon y en tejido pancreático a las seis semanas [179]. Esto podría suponer un mecanismo indirecto de proliferación temprana. La actividad proliferativa precoz queda patente de manera indirecta por el aumento del número de células por área de insulina a las doce semanas (Figura 80 y 95).

Otra hormona interesante en la evolución de las tasas de proliferación de la GV es la ghrelina, hormona que en la literatura ha provocado mucha controversia. En humanos parece descender sus niveles séricos tras GV [180]. En modelos animales sanos a las dos [172], tres [149] y cuatro [152] semanas no parecen modificar sus niveles. Aunque si a las doce semanas con diferencias estadísticamente significativas [152]. No obstante, no se tiene constancia de ningún estudio más en profundidad sobre sus efectos en el páncreas, por lo que aún queda por dilucidar qué papel juega en la fisiología de la CB.

Como conclusión podemos afirmar que lo observado en páncreas de animales sometidos a GV, a los tres meses de la intervención, puede deberse a un mecanismo de compensación, con un descenso de la tasa de mitosis celular tras una importante actividad proliferativa temprana.

En la literatura solo hallamos datos indirectos de proliferación que puedan apoyar nuestros resultados en el grupo sometido a RI50. En esta línea, algún trabajo previo en ratas

sanas tras RI50 analiza precozmente niveles de GLP-1 y GIP en sangre [143]. Otros muestran elevación de los niveles GLP-1 y PYY significativos a las 12 semanas tras la cirugía, en un modelo de ratas obesas y diabéticas [137]. Este fenómeno podría estimular la proliferación de células beta en los islotes pancreáticos [168].

No existen datos en humanos sanos tras CB, aunque sí estudios tras resecciones pancreáticas (por nesidioblastosis tras BG) que muestran el aumento de la proliferación a través del aumento de la expresión de IGF2, IGF1R α , y TGF β R3 en los islotes pancreáticos en comparación con los controles [181].

Como en el caso de animales sometidos a cirugía con BG o GV, los datos obtenidos en este estudio para el grupo RI50, apoyados por estudios actuales ya comentados [137,143], podrían avalar la existencia de señales endocrinas que inducirían cambios en la población celular beta modificando sus tasas de proliferación. Este efecto se produce con el objetivo de llevar a cabo la adaptación a la nueva situación y encontrar nuevamente el equilibrio. Las enterohormonas (tales como GLP-1, GIP, PPY, PYY, Ghrelina, etc.) parecen jugar un papel importante en este entramado de señales. No podemos olvidar otros estímulos que deben ser igualmente tenidos en cuenta (sistema nervioso, microbiota intestinal, sales biliares y ciclo entero-hepático) [182]. Este grado de complejidad nos permite aventurar un amplio campo de estudio encaminado a dilucidar los posibles factores responsables de los cambios que suceden a la realización de algún tipo de intervención bariátrica.

C.3. Estudio de los fenómenos de neogénesis en el páncreas

Atenderemos en esta sección a este proceso definiendo como neogénesis celular la formación de células beta a partir de precursores indiferenciados. A tenor de los resultados en nuestro estudio, podemos afirmar que al utilizar como marcador de neogénesis la presencia del factor de transcripción PDX-1 -característico de linajes celulares endocrinos- observamos un aumento de fenómenos de neogénesis exclusivamente en los páncreas de los animales sometidos a cirugía con BG (Figura 66 y 97).

Estos datos se ven apoyados tanto directamente como indirectamente por los estudios precedentes de algunos investigadores. En el caso de ratas GK no obesas han demostrado que tras cirugía bariátrica con BG existe un aumento de la expresión de PDX-1 [183].

Resulta interesante que en grupos de ratas GK (como modelo de DM2) comparándolas con un modelo de ratas Wistar se ha observado una disminución de la neogénesis en el grupo GK, sin mediar CB. Por lo que algunos autores proponen este

fenómeno celular como posible causa de la DM2 en el grupo de las ratas GK [84]. Otro artículo, esta vez en ratas Wistar tras resección del 90% del intestino delgado, propone una importante capacidad de regeneración y neogénesis sobre el páncreas como mecanismo compensatorio. A diferencia de ratas GK que tras la misma intervención no muestran esta capacidad [184]. Estos dos artículos muestran la incapacidad de ratas patológicas (GK) de generar mecanismos de proliferación. Es una incógnita no despejada que sucedería a nivel pancreática en el supuesto caso de utilizar un modelo RI50.

Así pues es posible que el fenómeno de neogénesis se vea incentivado por algún factor externo, tales como el incremento de una o varias enterohormonas. Al respecto, ha sido publicado que tras resección parcial pancreática secundario a nesidioblastosis por BG, el estudio del páncreas objetivó un aumento de la neogénesis en el tejido mediante el marcaje con PDX-1. La causa, según los autores, fue debida a una sobreestimulación por el GLP-1 que se encontraba cuatro veces por encima de los límites de la normalidad [185].

Todo lo anterior apoya la consistencia de nuestros datos y la capacidad fisiológica que tiene el páncreas tras la realización del BG de aumentar su capacidad de neogénesis. La ausencia de neogénesis por contra en los grupos RI50 y GV (Figura 50 y 82), en nuestro estudio y en la bibliografía, abre un campo inmenso para investigar. El componente mixto en el BG debe jugar un papel decisivo, quizás sinérgico al actuar en dos lugares anatómo-fisiológicos distintos.

C.4. Estudio de los fenómenos de apoptosis en la población de células beta pancreáticas

En relación a las tasa de apoptosis en la población celular beta de nuestro trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativo entre los cinco grupos a estudio. Al contrario de lo publicado hasta ahora en modelos patológicos (GK) [158, 171, 186]. Aunque sí parece una cierta tendencia hacia una menor tasa de apoptosis en los grupos a los que se les realizó CB. En ningún caso estadísticamente significativa (Figura 98).

Estudios previos si proponen una incidencia significativa de la CB sobre la apoptosis en la población celular beta, al menos en el caso de la cirugía con BG en modelos animales patológicos (ratas GK). Estos trabajos han mostrado un descenso de la apoptosis objetivada a través de la elevación de BCL-2 con una disminución del Bax y de la Caspasa 3 tras realización de BG [158]. En consonancia con otros autores que afirman una disminución de la apoptosis objetivada a través del BCL-2 [186]. O bien utilizando la

técnica TUNEL tras cuatro semanas de seguimiento, con resultados de claro descenso de la muerte programada [171].

En humanos parece que los mecanismos de aparición de DM2 son secundarios a un aumento de la tasa de apoptosis [187]. De la misma forma, parece que el aumento del GLP-1 tras cirugía de BG contribuye a la disminución de la apoptosis en humanos [188].

En *resumen* si bien nuestros datos no muestran variación entre los grupos estudiados, otros datos confirman que la tasa de apoptosis descendida en los islotes pancreáticos juega un papel importante en la reversión de la DM2 -al menos en modelos de ratas GK- tras BG. A diferencia de los modelos patológicos, en los sanos, la ausencia de diferencias estadísticas, a pesar de la tendencia, nos hace pensar que esta se deba a que los estímulos no sean suficientes para limitar la tasa de muerte celular programada. El abanderado, por tanto, en cuanto a los procesos celulares del islote con relación a la adaptación fisiológica a la CB, parece ser la modificación de la actividad proliferativa de la población celular beta.

D. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA HISTOMORFOMETRÍA Y LA MASA DE CÉLULAS BETA

D.1. Histomorfometría del páncreas

Dentro del estudio histomorfométrico del páncreas valoramos el área media de los islotes. En el grupo sometido a RI50, si bien esta área tiende a estar aumentada, no aparecen diferencias significativas (Figura 52). Respecto a los otros grupos sucede lo mismo, pero a la inversa, con el grupo CA (Figura 99).

Otro parámetro estudiado, el número absoluto de islotes, no varía en ninguno de los grupos, siendo este dato incluso más homogéneo que el área media (Figura 100).

Nuestros hallazgos se ven corroborados por lo poco que hemos encontrado en la literatura al respecto. Así en ratas sanas, aunque en modelo malabsortivo (derivación yeyunoileal), donde excluyen el 95% del intestino delgado del paso de nutrientes, describen la ausencia de cambios a nivel de los islotes pancreáticos, así como tampoco varían ni el área ni el tamaño. Todo esto ocurre a las cinco semanas de la cirugía [169].

Esta ausencia de cambios también parece darse en modelos patológicos, ya que el área media de islotes en ratas GK tras ser sometidas a GV fueron similares al control, sin diferencias a las 13 semanas de la intervención [189]. No obstante esto podría no ser así en humanos, ya que en otro modelo animal (cerdos castrados), tras dos semanas de supervivencia a la cirugía tras BG, se obtiene un aumento del número de islotes significativo y una tendencia a que el tamaño de los mismos sea mayor [190]. Esto último contrasta con los resultados en humanos, al observar tras BG un aumento del número y tamaño de los islotes [176, 181].

Esta ausencia de diferencias en los resultados tal vez podría deberse al poco tiempo del estudio tras la cirugía, ya que, si bien no muestra diferencias significativas, marca ciertas tendencias, que podrían suponer la necesidad de prolongar el tiempo de estudio para obtener resultados más potentes.

La segunda opción, podría ser todo lo contrario, la interpretación de los páncreas es tardía. Los estímulos a nivel de los islotes ya han ocurrido, y en el momento del estudio ya están revirtiendo los acontecimientos celulares que hayan ocurrido en dichos islotes. Por tanto las modificaciones han sucedido previamente a las doce semanas.

D.2. Estudio de la masa de células beta pancreática

La modificación en la masa celular beta tras la CB es la expresión de los cambios que se producen en el páncreas endocrino. Cambios necesarios en el islote pancreático para adaptarse a las nuevas condiciones, hasta alcanzar de nuevo el equilibrio. Estos últimos deben ser lo suficientemente potentes y mantenidos en el tiempo para que se traduzcan en una modificación de la masa celular beta

En este sentido, si atendemos a la definición de masa beta [191, 192], es necesario la observación multifactorial de área de los islotes, del tejido pancreático y del peso del páncreas. Todo esto constituye un novedoso apartado del presente trabajo, ya que hasta ahora ningún otro estudio había valorado este parámetro tras la realización de CB, ni en modelos animales o humanos.

A la luz de nuestros resultados la masa celular beta se muestra aumentada significativamente en el grupo del RI50, a las doce semanas de la realización de la cirugía, respecto a los grupos controles. En el caso del grupo correspondiente al BG existe una cierta tendencia al incremento no estadísticamente significativa. Por último el grupo GV en relación a la valoración de la masa de células beta se comporta de igual manera que los grupos controles a lo largo del estudio (Figura 55, 71, 87 y 102).

Salvando las distancias metodológicas, por supuesto, nuestros datos aun así se ven hasta cierto punto corroborados por trabajos previos tales como el realizado en cerdos en los cuales no se tiene en cuenta el peso del páncreas. En estos, tras BG a las dos semanas si existe aumento de la masa beta con diferencias significativas [190].

En nuestros datos y en relación a lo anterior, la ausencia de diferencias significativas en los valores para la masa celular beta de los páncreas del grupo de animales sometidos a BG y sus controles puede ser debido a la potencia estadística del estudio. O a la necesidad de un periodo de supervivencia más prolongado tras la cirugía, que permita traducir los cambios fisiológicos acaecidos en el islote, en un incremento de la masa celular beta.

Para terminar, no podemos olvidar que la homeostasis de la glucosa es un puzzle con varios artífices: páncreas, tubo digestivo, sistema nervioso y el tejido periférico. Todos se encuentran interrelacionados y conectados. Los resultados mostrados son sólo parciales y centrados en algunos aspectos del páncreas. El estudio funcional e histológico de los diversos componentes de este puzzle conformará el libro de la fisiología en la CB, clave para

entender los mecanismos de reversión de la DM2 en animales de experimentación y humanos.

E. UNA VISIÓN DE CONJUNTO

En algunos casos en trabajos de este tipo, dado el gran número de resultados y datos aportados, puede generarse una visión borrosa del objetivo final a estudio. En este apartado y de manera resumida pretendemos centrar el esfuerzo no ya en exponer el detalle sino en encajar, en la medida de lo posible, el gran número de piezas o al menos de las que disponemos, para conocer los mecanismos fisiológicos que se ponen en marcha tras la CB.

El estudio inmunohistoquímico del páncreas en nuestro trabajo ha relevado datos interesantes:

- En primer lugar la tasa de proliferación a los tres meses permanece elevada conjuntamente en el BG y el RI50, mientras que en el grupo sometido a la GV esta descendida (Figura 96). Además el número de núcleos por área se encuentra elevado de manera estadísticamente significativa en la GV y BG, no así en el grupo sometido a RI50 (Figura 95).
- Los fenómenos de neogénesis solo los hemos podido observar en los páncreas del grupo sometido a BG (Figura 97). Esta técnica mixta podría potenciar señales adicionales que permitan esta vía proliferativa.
- Como característica común en los tres grupos, la apoptosis, no parece ser la causa de los cambios que suceden, aunque existe una ligera menor tasa que en los controles (Figura 98).
- La masa celular beta, está elevada de manera significativa en el RI50. El BG posee una importante tendencia, aunque no sea significativa, mientras que la GV se equipara en este sentido a los controles (Figura 102).

Es por todo lo anterior, otro motivo para pensar que a pesar de conseguir el mismo fin; reversión de la DM2, los mecanismos a partir de los cuáles se obtienen no son iguales y pueden producirse, además, en diferente momento cronológico.

El estado previo del roedor (sano, obeso y/o DM2), pueden potenciar/minimizar los mecanismos de las hormonas gastrointestinales, que puedan a su vez acelerar o modificar -cuantitativa y/o cualitativamente- los resultados histomorfofuncionales del páncreas y la regulación de la glucosa.

F. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En el presente proyecto y tras la valoración de los resultados reconocemos las siguientes limitaciones:

Las similitudes pero también las diferencias entre el humano y las ratas son evidentes. La cirugía metabólica en el contexto de la cirugía bariátrica no permite una comparación ni una extrapolación exacta de los resultados. Existen, además, variables imposibles de controlar en el humano. Resultados obtenidos en animales, en este caso ratas, por motivos éticos, no se pueden realizar en humanos. Es por ello que, diversos puntos de la discusión no podrán corroborarse en humanos.

El número de ejemplares utilizados para el estudio es suficiente para obtener diferencias estadísticas plausibles, a pesar de los resultados reconocemos que con una n muestral más elevada quizás hubiésemos obtenidos resultados más firmes en aquellos resultados en los que existen solo tendencias. El tiempo y las limitaciones económicas nos han obligado a acotar nuestro estudio a lo ya expuesto.

Existen otra serie de determinaciones tanto funcionales como histológicas que apuntalarían aún más los resultados. Aunque los objetivos del estudio están definidos, es sensato reconocer que profundizar aún más en estos mecanismos enriquecerían los resultados.

CONCLUSIONES

1. Nuestros modelos quirúrgicos reproducen las modificaciones funcionales observadas, tanto en las técnicas de cirugía bariátrica, como en cirugía abdominal que implique resecciones intestinales masivas en el ser humano. Entre estas alteraciones funcionales observamos patrones distintos de adaptación entre dichos grupos experimentales que afectan al incremento ponderal de peso y de ingesta.
2. El páncreas endocrino en nuestros modelos experimentales se ve alterado por las condiciones anatomo-funcionales derivadas tras las técnicas quirúrgicas. La naturaleza y la intensidad de dichos cambios histológicos son distintas para cada tipo de experiencia quirúrgica.
3. Las condiciones fisiológicas del metabolismo hidrocarbonado se ven alteradas por procesos adaptativos a las variantes quirúrgicas. Dichas adaptaciones provocan cambios en los parámetros del metabolismo de la glucosa, con un marcado carácter temporal y evolutivo.
4. Dado que la evolución temporal de los procesos de renovación celular en el páncreas endocrino están sujetos a las condiciones fisiológicas alteradas, la expresión de algunos procesos deben haberse producido en momentos previos al sacrificio de los especímenes, o pueden tener continuidad en el tiempo. Parte de nuestro estudio es una observación puntual en un periodo de supervivencia concreto, que muestra estos resultados.
5. Una expresión de los mecanismos responsables de estímulo sobre el páncreas endocrino deben estar mediados, en los casos de resecciones masivas y de exclusión duodenoyeyunal, por las modificaciones funcionales que se ponen de manifiesto en los fenómenos secundarios y transitorios de intolerancia a la glucosa. Por el contrario, la cirugía que afecta solo al estómago no provoca dicha intolerancia.

6. A tenor de nuestros resultados, la resección o exclusión siempre parciales del yeyuno, se correlacionan con la expresión más significativa de cambios histológicos en el islote pancreático, dado que es el elemento común en las técnicas mixtas y malabsortiva.
7. En todas las técnicas quirúrgicas desarrolladas, el fenómeno celular observado a nivel del islote pancreático es la proliferación, asociando mecanismos de neogénesis específicamente en el caso del Bypass gástrico.
8. Frente a las hipótesis que centran la atención en las porciones proximales (*Foregut*) y/o distales (*Hindgut*), nuestros resultados nos llevan a reivindicar la importancia del segmento yeyunal como responsable de modificaciones en el eje entero-insular. Por ello proponemos la teoría del *Middlegut* como expresión de este fenómeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Noguchi, H., Pancreatic stem/progenitor cells for the treatment of diabetes. *Rev Diabet Stud*, 2010. 7(2): p. 105-11.
2. Pagliuca, F.W. and D.A. Melton, How to make a functional beta-cell. *Development*, 2013. 140(12): p. 2472-83.
3. Karam, J.H., Reversible insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 1996. 28(9): p. 440-4.
4. Busnardo, A.C., et al., History of the pancreas. *Am J Surg*, 1983. 146(5): p. 539-50.
5. De Sharp, P. and J.S. Villano, Important biological features, in *The laboratory rat*. 2013, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL. p. 9-11, 19.
6. Vladimír Komárek, et al., Synopsis of the Organ Anatomy, in *The Laboratory Rat* G.J. Krinke, Editor. 2000, Elsevier. p. 283-319.
7. Cleaver, O. and Y. Dor, Vascular instruction of pancreas development. *Development*, 2012. 139(16): p. 2833-43.
8. Taborsky, G.J., Jr., The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol*, 2010. 4(6): p. 1338-44.
9. DeSesso, J.M. and C.F. Jacobson, Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol*, 2001. 39(3): p. 209-28.
10. Chandra, R. and R.A. Liddle, Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009. 25(5): p. 441-6.
11. Begg, D.P. and S.C. Woods, Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv Physiol Educ*, 2013. 37(1): p. 53-60.
12. Bramswig, N.C. and K.H. Kaestner, Organogenesis and functional genomics of the endocrine pancreas. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69(13): p. 2109-23.
13. Wierup, N., et al., The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*, 2002. 107(1-3): p. 63-9.
14. Granata, R., et al., Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol*, 2010. 45(3): p. 107-118.
15. Suckale, J. and M. Solimena, Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci*, 2008. 13: p. 7156-71.
16. Orci, L., The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism*, 1976. 25(11 Suppl 1): p. 1303-13.
17. Saisho, Y., et al., beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*, 2013. 36(1): p. 111-7.
18. Edlund, T., et al., Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science*, 1985. 230(4728): p. 912-6.

19. Quesada, I., et al., Glucose induces opposite intracellular Ca^{2+} concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes*, 2006. 55(9): p. 2463-9.
20. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 2013. 9(1): p. 25-53.
21. Cabrera, O., et al., The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): p. 2334-9.
22. Steiner, D.J., et al., Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2010. 2(3): p. 135-45.
23. Brelje, T.C., D.W. Scharp, and R.L. Sorenson, Three-dimensional imaging of intact isolated islets of Langerhans with confocal microscopy. *Diabetes*, 1989. 38(6): p. 808-14.
24. Cryer, P.E., Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology*, 2012. 153(3): p. 1039-48.
25. Quesada, I., et al., Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*, 2008. 199(1): p. 5-19.
26. Gerich, J.E., Use of somatostatin in the study of carbohydrate homeostasis in man: physiologic, pathologic, and therapeutic considerations. *Adv Exp Med Biol*, 1977. 87: p. 299-318.
27. Kelly, C., N.H. McClenaghan, and P.R. Flatt, Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets*, 2011. 3(2): p. 41-7.
28. Wang, X., et al., Quantitative analysis of pancreatic polypeptide cell distribution in the human pancreas. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e55501.
29. Wierup, N., F. Sundler, and R.S. Heller, The islet ghrelin cell. *J Mol Endocrinol*, 2013. 52(1): p. R35-49.
30. Granata, R. and E. Ghigo, Products of the ghrelin gene, the pancreatic beta-cell and the adipocyte. *Endocr Dev*, 2013. 25: p. 144-56.
31. Dezaki, K., H. Sone, and T. Yada, Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol Ther*, 2008. 118(2): p. 239-49.
32. Meyer, C., Final answer: ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? *Diabetes*, 2010. 59(11): p. 2726-8.
33. Salehi, A., et al., Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept*, 2004. 118(3): p. 143-50.
34. van de Bunt, M. and A.L. Gloyn, A tale of two glucose transporters: how GLUT2 re-emerged as a contender for glucose transport into the human beta cell. *Diabetologia*, 2012. 55(9): p. 2312-5.

35. Rhodes, C.J., et al., Direct autocrine action of insulin on beta-cells: does it make physiological sense? *Diabetes*, 2013. 62(7): p. 2157-63.
36. Gaisano, H.Y., P.E. Macdonald, and M. Vranic, Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 349.
37. Finegood, D.T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir, Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*, 1995. 44(3): p. 249-56.
38. Bonner-Weir, S., et al., Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 2010. 59(10): p. 2340-8.
39. Bouwens, L. and I. Rooman, Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*, 2005. 85(4): p. 1255-70.
40. Del Prato, S., et al., Beta-cell mass plasticity in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 2004. 6(5): p. 319-31.
41. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
42. Montanya, E., et al., Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*, 2000. 49(8): p. 1341-6.
43. Bonner-Weir, S., et al., Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. *Rev Diabet Stud*, 2012. 9(4): p. 407-16.
44. Juhl, K., S. Bonner-Weir, and A. Sharma, Regenerating pancreatic beta-cells: plasticity of adult pancreatic cells and the feasibility of in-vivo neogenesis. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. 15(1): p. 79-85.
45. Zhang, S.Q., et al., Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(12): p. 4062-72.
46. Srinivasan, S., et al., Enteric neuroblasts require the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Forkhead pathway for GDNF-stimulated survival. *Mol Cell Neurosci*, 2005. 29(1): p. 107-19.
47. Lavery, W., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt nonautonomously promote perineurial glial growth in *Drosophila* peripheral nerves. *J Neurosci*, 2007. 27(2): p. 279-88.
48. Migliorini, A., E. Bader, and H. Lickert, Islet cell plasticity and regeneration. *Mol Metab*, 2014. 3(3): p. 268-74.
49. Chen, C., et al., Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest*, 1994. 94(4): p. 1616-20.
50. Pipeleers, D.G., Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes*, 1992. 41(7): p. 777-81.

51. Yabe, D. and Y. Seino, Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol*, 2011. 107(2): p. 248-56.
52. Kim, M.H. and M.K. Lee, The Incretins and Pancreatic beta-Cells: Use of Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide to Cure Type 2 Diabetes Mellitus. *Korean Diabetes J*, 2010. 34(1): p. 2-9.
53. Lausier, J., et al., Vagal control of pancreatic ss-cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 299(5): p. E786-93.
54. Medina, A., et al., Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic beta-cells. *Endocr J*, 2013. 60(5): p. 687-96.
55. Lin, Y. and Z. Sun, Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 2010. 204(1): p. 1-11.
56. Sabater Ortí, L.C.C., J. Lledó Matoses, S., El páncreas. Embriología, anatomía, métodos de estudio y técnicas quirúrgicas. , in *Cirugía biliopancreática*, D.F.-C. Casanova, L. Pardo, F., Editor. 2009, Arán: España. p. 115-146.
57. Ahren, B., Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr Mol Med*, 2005. 5(3): p. 275-86.
58. Wajchenberg, B.L., beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev*, 2007. 28(2): p. 187-218.
59. Lin, Y. and Z. Sun, Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 204(1): p. 1-11.
60. DeFronzo, R.A., Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 2009. 58(4): p. 773-95.
61. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 1979. 237(3): p. E214-23.
62. Ahren, B. and G. Pacini, Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol*, 2004. 150(2): p. 97-104.
63. Matthews, D.R., et al., Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985. 28(7): p. 412-9.
64. Bensellam, M., D.R. Laybutt, and J.C. Jonas, The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 364(1-2): p. 1-27.
65. Cernea, S. and M. Dobreanu, Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem Med (Zagreb)*, 2013. 23(3): p. 266-80.

66. Meier, J.J. and M.A. Nauck, Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes*, 2010. 59(5): p. 1117-25.
67. Vilsboll, T. and J.J. Holst, Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2004. 47(3): p. 357-66.
68. Nauck, M.A., Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in the treatment of diabetes. *Horm Metab Res*, 2004. 36(11-12): p. 852-8.
69. Holst, J.J., T. Vilsboll, and C.F. Deacon, The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. 297(1-2): p. 127-36.
70. DeFronzo, R.A., Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*, 2004(143): p. 9-21.
71. Kim, J.W. and K.H. Yoon, Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells. *Diabetes Metab J*, 2011. 35(5): p. 444-50.
72. Rutti, S., et al., Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 2009. 150(10): p. 4521-30.
73. Prentki, M., et al., Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, 2002. 51 Suppl 3: p. S405-13.
74. Genovese, S., et al., Clinical phenotype and beta-cell autoimmunity in Italian patients with adult-onset diabetes. *Eur J Endocrinol*, 2006. 154(3): p. 441-7.
75. Donath, M.Y., et al., Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*, 2009. 24: p. 325-31.
76. Dunmore, S.J. and J.E. Brown, The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 2013. 216(1): p. T37-45.
77. Jurgens, C.A., et al., beta-cell loss and beta-cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2632-40.
78. Staiger, H., et al., Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev*, 2009. 30(6): p. 557-85.
79. Henquin, J.C., et al., Pancreatic beta-cell mass or beta-cell function? That is the question! *Diabetes Obes Metab*, 2008. 10 Suppl 4: p. 1-4.
80. Hanley, S.C., et al., {beta}-Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes. *Endocrinology*, 2010. 151(4): p. 1462-72.
81. Prentki, M. and C.J. Nolan, Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1802-12.
82. Cho, J.H., et al., beta-cell mass in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*, 2011. 2(1): p. 6-17.
83. Butler, A.E., et al., Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003. 52(1): p. 102-10.

84. Movassat, J., et al., Type 2 diabetes - a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes Obes Metab*, 2007. 9 Suppl 2: p. 187-95.
85. Deurenberg, P. and M. Yap, The assessment of obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 1999. 13(1): p. 1-11.
86. Mun, E.C., G.L. Blackburn, and J.B. Matthews, Current status of medical and surgical therapy for obesity. *Gastroenterology*, 2001. 120(3): p. 669-81.
87. Leroux, J.S., S. Moore, and L. Dube, Beyond the "I" in the obesity epidemic: a review of social relational and network interventions on obesity. *J Obes*, 2013. 2013: p. 348249.
88. Finucane, M.M., et al., National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*, 2011. 377(9765): p. 557-67.
89. Gloy, V.L., et al., Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 2013. 347: p. f5934.
90. Mathus-Vliegen, E.M., Prevalence, pathophysiology, health consequences and treatment options of obesity in the elderly: a guideline. *Obes Facts*, 2012. 5(3): p. 460-83.
91. Wing, R.R., et al., Insulin, body mass index, and cardiovascular risk factors in premenopausal women. *Arteriosclerosis*, 1989. 9(4): p. 479-84.
92. Flegal, K.M., et al., Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2013. 309(1): p. 71-82.
93. Kramer, C.K., B. Zinman, and R. Retnakaran, Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 2013. 159(11): p. 758-69.
94. Albanese, E., et al., Weight loss and premature death: the 1946 british birth cohort study. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86282.
95. Oda, E., Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations. *Acta Diabetol*, 2012. 49(2): p. 89-95.
96. Colosia, A.D., R. Palencia, and S. Khan, Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013. 6: p. 327-338.
97. de Luca, C. and J.M. Olefsky, Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*, 2008. 582(1): p. 97-105.
98. Ahima, R.S., Digging deeper into obesity. *J Clin Invest*, 2011. 121(6): p. 2076-9.
99. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell*, 2012. 148(6): p. 1160-71.

100. Gill, R.S., et al., The impact of obesity on diabetes mellitus and the role of bariatric surgery. *Maturitas*, 2011. 69(2): p. 137-40.
101. Lloyd-Jones, D.M., et al., Consistently stable or decreased body mass index in young adulthood and longitudinal changes in metabolic syndrome components: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circulation*, 2007. 115(8): p. 1004-11.
102. Wing, R.R., et al., Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care*, 1994. 17(1): p. 30-6.
103. Rao, R.S., V. Rao, and S. Kini, Animal models in bariatric surgery--a review of the surgical techniques and postsurgical physiology. *Obes Surg*, 2010. 20(9): p. 1293-305.
104. Kodama, Y., et al., Mechanistic comparison between gastric bypass vs. duodenal switch with sleeve gastrectomy in rat models. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e72896.
105. Deitel, M. and J. Melissas, The origin of the word "bari". *Obes Surg*, 2005. 15(7): p. 1005-8.
106. Ribaric, G., J.N. Buchwald, and T.W. McGlennon, Diabetes and Weight in Comparative Studies of Bariatric Surgery vs Conventional Medical Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg*, 2014. 24(3): p. 437-55.
107. Fried, M., Bariatric and metabolic surgery. *Minerva Endocrinol*, 2013. 38(3): p. 237-44.
108. Rubino, F., et al., Metabolic surgery: the role of the gastrointestinal tract in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 6(2): p. 102-9.
109. Lautz, D., et al., The great debate: medicine or surgery: what is best for the patient with type 2 diabetes? *Diabetes Care*, 2011. 34(3): p. 763-70.
110. Kasama, K., et al., IFSO-APC consensus statements 2011. *Obes Surg*, 2012. 22(5): p. 677-84.
111. Ochner, C.N., et al., Changes in neurohormonal gut peptides following bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)*, 2011. 35(2): p. 153-66.
112. Hng, K.N. and Y.S. Ang, Overview of bariatric surgery for the physician. *Clin Med*, 2012. 12(5): p. 435-40.
113. Buse, J.B., et al., How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care*, 2009. 32(11): p. 2133-5.
114. Friedman, M.N., A.J. Sancetta, and G.J. Magovern, The amelioration of diabetes mellitus following subtotal gastrectomy. *Surg Gynecol Obstet*, 1955. 100(2): p. 201-4.
115. Thaler, J.P. and D.E. Cummings, Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology*, 2009. 150(6): p. 2518-25.

116. Buchwald, H., et al., Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2004. 292(14): p. 1724-37.
117. Lee, W.J., et al., Laparoscopic sleeve gastrectomy for diabetes treatment in nonmorbidly obese patients: efficacy and change of insulin secretion. *Surgery*, 2010. 147(5): p. 664-9.
118. Lee, W.J., et al., Gastric bypass vs sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Arch Surg*. 146(2): p. 143-8.
119. Li, J.F., et al., Comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass with laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity or type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Can J Surg*, 2013. 56(6): p. E158-64.
120. Li, P., et al., Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass vs. laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity and diabetes mellitus: a meta-analysis of sixteen recent studies. *Hepatogastroenterology*, 2013. 60(121): p. 132-7.
121. de Gordejuela, A.G., et al., Is sleeve gastrectomy as effective as gastric bypass for remission of type 2 diabetes in morbidly obese patients? *Surg Obes Relat Dis*, 2011. 7(4): p. 506-9.
122. Abbatini, F., et al., Long-term effects of laparoscopic sleeve gastrectomy, gastric bypass, and adjustable gastric banding on type 2 diabetes. *Surg Endosc*, 2010. 24(5): p. 1005-10.
123. Sauerland, S., et al., Obesity surgery: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surg Endosc*, 2005. 19(2): p. 200-21.
124. Rubino, F., Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis. *Diabetes Care*, 2008. 31 Suppl 2: p. S290-6.
125. Rao, R.S. and S. Kini, GIP and bariatric surgery. *Obes Surg*, 2011. 21(2): p. 244-52.
126. Rubino, F. and S.A. Amiel, Is the gut the "sweet spot" for the treatment of diabetes? *Diabetes*, 2014. 63(7): p. 2225-8.
127. Colucci, R.A., Bariatric surgery in patients with type 2 diabetes: a viable option. *Postgrad Med*, 2011. 123(1): p. 24-33.
128. Folli, F., A.E. Pontiroli, and W.H. Schwesinger, Metabolic aspects of bariatric surgery. *Med Clin North Am*, 2007. 91(3): p. 393-414, x.
129. Akkary, E., Bariatric surgery evolution from the malabsorptive to the hormonal era. *Obes Surg*, 2012. 22(5): p. 827-31.
130. Rubino, F., et al., Metabolic surgery: the role of the gastrointestinal tract in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 2010. 6(2): p. 102-9.
131. Troke, R.C., T.M. Tan, and S.R. Bloom, The future role of gut hormones in the treatment of obesity. *Ther Adv Chronic Dis*, 2014. 5(1): p. 4-14.
132. Cummings, D.E., J. Overduin, and K.E. Foster-Schubert, Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2608-15.

133. Cummings, D.E. and D.R. Flum, Gastrointestinal surgery as a treatment for diabetes. *JAMA*, 2008. 299(3): p. 341-3.
134. Pham, S., et al., Comparison of the effectiveness of four bariatric surgery procedures in obese patients with type 2 diabetes: a retrospective study. *J Obes*, 2014. 2014: p. 638203.
135. Ochner, C.N., et al., Pre-bariatric surgery weight loss requirements and the effect of preoperative weight loss on postoperative outcome. *Int J Obes (Lond)*, 2012. 36(11): p. 1380-7.
136. Sandoval, D., Bariatric surgeries: beyond restriction and malabsorption. *Int J Obes (Lond)*, 2011. 35 Suppl 3: p. S45-9.
137. Duan, J., et al., Mid to distal small bowel resection with the preservation of the terminal ileum improves glucose homeostasis in diabetic rats by activating the hindgut-dependent mechanism. *J Gastrointest Surg*, 2014. 18(6): p. 1186-93.
138. Valenti, V., et al., Sleeve gastrectomy induces weight loss in diet-induced obese rats even if high-fat feeding is continued. *Obes Surg*, 2011. 21(9): p. 1438-43.
139. Furnes, M.W., et al., Gastric bypass surgery causes body weight loss without reducing food intake in rats. *Obes Surg*, 2008. 18(4): p. 415-22.
140. Zheng, H., et al., Meal patterns, satiety, and food choice in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. 297(5): p. R1273-82.
141. Shin, A.C., et al., Longitudinal assessment of food intake, fecal energy loss, and energy expenditure after Roux-en-Y gastric bypass surgery in high-fat-fed obese rats. *Obes Surg*, 2013. 23(4): p. 531-40.
142. Yu, H., X. Zheng, and Z. Zhang, Mechanism of Roux-en-Y gastric bypass treatment for type 2 diabetes in rats. *J Gastrointest Surg*, 2013. 17(6): p. 1073-83.
143. Salinari, S., et al., Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats without changes in incretins or insulin secretion. *Diabetes*, 2014. 63(3): p. 1069-78.
144. Wapnick, S. and J.J. Jones, Changes in glucose tolerance and serum insulin following partial gastrectomy and intestinal resection. *Gut*, 1972. 13(11): p. 871-3.
145. Kajawara, T., T. Szuki, and T. Tobe, Effect of massive bowel resection on enteroinsular axis. *Gut*, 1979. 20(9): p. 806-10.
146. Nausheen, S., et al., Effects of sleeve gastrectomy and ileal transposition, alone and in combination, on food intake, body weight, gut hormones, and glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. 305(4): p. E507-18.
147. Patrikakos, P., et al., A surgical rat model of sleeve gastrectomy with staple technique: long-term weight loss results. *Obes Surg*, 2009. 19(11): p. 1586-90.
148. Kodama, Y., et al., Eating behavior in rats subjected to vagotomy, sleeve gastrectomy, and duodenal switch. *J Gastrointest Surg*, 2010. 14(10): p. 1502-10.

149. Guimaraes, M., et al., Sleeve gastrectomy and gastric plication in the rat result in weight loss with different endocrine profiles. *Obes Surg*, 2013. 23(5): p. 710-7.
150. de Bona Castelan, J., et al., Sleeve gastrectomy model in Wistar rats. *Obes Surg*, 2007. 17(7): p. 957-61.
151. Trung, V.N., et al., Effect of sleeve gastrectomy on body weight, food intake, glucose tolerance, and metabolic hormone level in two different rat models: Goto-Kakizaki and diet-induced obese rat. *J Surg Res*, 2013. 185(1): p. 159-65.
152. Zhou, D., et al., Impact of bariatric surgery on ghrelin and obestatin levels in obesity or type 2 diabetes mellitus rat model. *J Diabetes Res*, 2014. 2014: p. 569435.
153. Sun, D., et al., Sub-sleeve gastrectomy achieves good diabetes control without weight loss in a non-obese diabetic rat model. *Surg Endosc*, 2014. 28(3): p. 1010-8.
154. Ferrer-Marquez, M., R. Belda-Lozano, and M. Ferrer-Ayza, Technical controversies in laparoscopic sleeve gastrectomy. *Obes Surg*, 2012. 22(1): p. 182-7.
155. Chambers, A.P., et al., Weight-independent changes in blood glucose homeostasis after gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in rats. *Gastroenterology*, 2011. 141(3): p. 950-8.
156. Chambers, A.P., et al., Similar effects of roux-en-Y gastric bypass and vertical sleeve gastrectomy on glucose regulation in rats. *Physiol Behav*, 2011. 105(1): p. 120-3.
157. Kopsombut, G., et al., Partial small bowel resection with sleeve gastrectomy increases adiponectin levels and improves glucose homeostasis in obese rodents with type 2 diabetes. *World J Surg*, 2012. 36(6): p. 1432-8.
158. Liu, Y., et al., Roux-en-Y gastric bypass-induced improvement of glucose tolerance and insulin resistance in type 2 diabetic rats are mediated by glucagon-like peptide-1. *Obes Surg*, 2011. 21(9): p. 1424-31.
159. Jorgensen, N.B., et al., Exaggerated glucagon-like peptide 1 response is important for improved beta-cell function and glucose tolerance after Roux-en-Y gastric bypass in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2013. 62(9): p. 3044-52.
160. Jorgensen, N.B., et al., Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with Type 2 diabetes and normal glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. 303(1): p. E122-31.
161. Jacobsen, S.H., et al., Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects. *Obes Surg*, 2012. 22(7): p. 1084-96.
162. Kim, W.S., et al., Resolution of type 2 diabetes after gastrectomy for gastric cancer with long limb Roux-en Y reconstruction: a prospective pilot study. *J Korean Surg Soc*, 2013. 84(2): p. 88-93.
163. Wang, K.C., et al., Outcome after curative surgery for gastric cancer patients with type 2 diabetes. *World J Surg*, 2014. 38(2): p. 431-8.

164. Fleck, U., et al., [How does the islet cell organ react to glucose following extensive resection of the small intestine?]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*, 1987. 20(4): p. 212-23.
165. Tamura, K., et al., Functional alteration of islet cells after jejunal or ileal resection in dogs. *Diabetes*, 1978. 27(12): p. 1156-66.
166. Kadera, B.E., et al., Evidence for a metabolic mechanism in the improvement of type 2 diabetes after sleeve gastrectomy in a rodent model. *Surg Obes Relat Dis*, 2013. 9(3): p. 447-52.
167. Eickhoff, H., et al., Insulin resistance and beta cell function before and after sleeve gastrectomy in obese patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes. *Surg Endosc*, 2014.
168. Portha, B., C. Tourrel-Cuzin, and J. Movassat, Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass. *Exp Diabetes Res*, 2011. 2011: p. 376509.
169. Pederson, R.A., et al., Effect of jejunoileal bypass in the rat on the enteroinsular axis. *Regul Pept*, 1982. 5(1): p. 53-63.
170. Blech, W., et al., [Effect of subtotal small intestine resection on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas following glucose stimulation]. *Biomed Biochim Acta*, 1985. 44(5): p. 723-35.
171. Chai, F., et al., Adiponectin downregulates hyperglycemia and reduces pancreatic islet apoptosis after roux-en-y gastric bypass surgery. *Obes Surg*, 2011. 21(6): p. 768-73.
172. Perefferrer, F.S., et al., Influence of sleeve gastrectomy on several experimental models of obesity: metabolic and hormonal implications. *Obes Surg*, 2008. 18(1): p. 97-108.
173. Xu, J., et al., [Impact of residual islet function on the glycemia changes of type 1 diabetic rats after gastric bypass]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2012. 15(8): p. 859-61.
174. Sasaki, M., et al., Effect of ageing on pancreatic hyperplasia after 90% proximal small bowel resection. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997. 12(5): p. 376-81.
175. Yoshinaga, K., et al., Stimulation of pancreatic growth. Distal small bowel resection mediated by increased levels of cholecystokinin. *Ann Surg*, 1996. 224(2): p. 139-44.
176. Reubi, J.C., et al., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors are not overexpressed in pancreatic islets from patients with severe hyperinsulinaemic hypoglycaemia following gastric bypass. *Diabetologia*, 2010. 53(12): p. 2641-5.
177. Taqi, E., et al., The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model. *J Pediatr Surg*, 2010. 45(5): p. 987-95.
178. Chabot, F., et al., Interrelationships between ghrelin, insulin and glucose homeostasis: Physiological relevance. *World J Diabetes*, 2014. 5(3): p. 328-41.

179. Johannessen, H., et al., Eating behavior and glucagon-like peptide-1-producing cells in interposed ileum and pancreatic islets in rats subjected to ileal interposition associated with sleeve gastrectomy. *Obes Surg*, 2013. 23(1): p. 39-49.
180. Anderson, B., et al., The impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on plasma ghrelin levels: a systematic review. *Obes Surg*, 2013. 23(9): p. 1476-80.
181. Rumilla, K.M., et al., Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis: histologic features and growth factor expression. *Mod Pathol*, 2009. 22(2): p. 239-45.
182. Haluzik, M., Bariatric surgery and the mechanism of diabetes remission: are we getting there? *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. 98(11): p. 4336-8.
183. Li, Z., et al., Roux-en-Y gastric bypass promotes expression of PDX-1 and regeneration of beta-cells in Goto-Kakizaki rats. *World J Gastroenterol*, 2010. 16(18): p. 2244-51.
184. Plachot, C., J. Movassat, and B. Portha, Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem Cell Biol*, 2001. 116(2): p. 131-9.
185. Rabiee, A., et al., Hyperinsulinemic hypoglycemia after Roux-en-Y gastric bypass: unraveling the role of gut hormonal and pancreatic endocrine dysfunction. *J Surg Res*, 2011. 167(2): p. 199-205.
186. Tian, X.F., et al., [Effects of Gastric bypass surgery on the apoptosis of islet beta-cells in type 2 nonobese diabetic (NOD) rats and its mechanism]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2010. 48(23): p. 1794-9.
187. Kim, J.W., et al., Loss of beta-cells with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci*, 2008. 13: p. 6022-33.
188. Farilla, L., et al., Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*, 2003. 144(12): p. 5149-58.
189. Inabnet, W.B., et al., The utility of [(11)C] dihydrotetrabenazine positron emission tomography scanning in assessing beta-cell performance after sleeve gastrectomy and duodenal-jejunal bypass. *Surgery*, 2010. 147(2): p. 303-9.
190. Lindqvist, A., et al., Gastric bypass improves beta-cell function and increases beta-cell mass in a porcine model. *Diabetes*, 2014. 63(5): p. 1665-71.
191. Perez-Arana, G., et al., Decrease in {beta}-cell proliferation precedes apoptosis during diabetes development in bio-breeding/worcester rat: beneficial role of Exendin-4. *Endocrinology*, 2010. 151(6): p. 2538-46.
192. Turrel, C., et al., Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*, 2002. 51(5): p. 1443-52.

ANEXOS

Profs. F. Hernández and J.F. Madrid, Editors
School of Medicine
University of Murcia
30100 Espinardo – MURCIA
SPAIN Fax: 34-868887508 /34-868884150 e-mail: jfmadrid@um.es

Histology and
Istopathology
<http://www.hh.um.es>

Our reference: B-5311
Dr. J. Arturo Prada Oliveira
Department of Human Anatomy and Embryology
Faculty of Medicine
Plaza Fragela s/n
University of Cádiz
Cádiz, 11003.
Email: arturo.prada@uca.es.

November 14, 2014

Dear Dr. Prada Oliveira,

I am pleased to inform you that your article entitled “A surgical model of short bowel syndrome induces a long-lasting increase in pancreatic beta-cell mass (by Gonzalo Pérez-Arana, Alonso Camacho-Ramírez, M. Carmen Segundo-Iglesias, Alfonso M. Lechuga-Sancho, Eva Sancho-Maraver, Manuel Aguilar-Diosdado and José Arturo Prada-Oliveira)” has been now formally accepted.

As soon as possible, you will receive the proofs.

Yours sincerely,



Prof. Juan F. Madrid, Editor

A surgical model of short bowel syndrome induces a long-lasting increase in pancreatic beta-cell mass

G. Pérez-Arana¹, A. Camacho-Ramírez², M.C. Segundo-Iglesias¹,
A.M. Lechuga-Sancho¹, E. Sancho-Maraver³, M. Aguilar-Diosdado¹ and J.A. Prada-Oliveira³

¹Endocrinology and Metabolism Clinical Unit, University Hospital Puerta del Mar, ²Surgery Unit, University Hospital Puerto Real, Puerto Real and ³Faculty of Medicine, University of Cádiz, Cádiz, Spain

Summary. Several surgical techniques are used nowadays as a severe treatment for obesity and diabetes mellitus type 2. These techniques are aggressive due to drastic changes in the nutrient flow and non-reversible modifications on the digestive tube. In this paper we present the effects of a massive intestinal resection on the pancreas. Results have shown that short bowel technique is less aggressive to normal anatomy and physiology of the intestinal tract than Gastric bypass or biliopancreatic diversion (e.g.). In this paper we reproduce a model of short bowel syndrome (SIC), with similar surgical conditions and clinical complications as seen in human cases. This work was conducted on normal Wistar rats, with no other concurrent factors, in order to determine the effects on normal pancreas islets. We measured pancreatic implications by histomorphometric studies, which included beta-cell mass by immunocytochemistry, and apoptosis/proliferation test with TUNEL technique and Ki-67. Briefly, we reported on an increased relative area of the islets of the pancreas, as well as an increase in the average size of islets in the SIC versus the control group. Furthermore we stated that this increase in size of the pancreatic islets is due to the mechanisms of proliferation of beta cells in animals undergoing SIC. These goals could reveal a direct influence of surgical modification of the digestive tract over the pancreatic beta cell homeostasis. In this sense, there are many potential stimulators of intestinal adaptation, including peptide hormones and growth

components which are associated or involved as effectors of the endocrine pancreas.

Key words: Pancreas, Diabetes, Bariatric-surgery, Insulin-Secreting Cells, Short-bowel syndrome

Introduction

Obesity has become a major public health problem due to its prevalence, costs and negative effects on health. The World Health Organization predicts that in the year 2015 obesity, as defined by a body mass index (BMI) of at least 30 kg/m², will affect approximately 700 million people around the world.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), characterized by insulin resistance and relative insulin insufficiency can be considered one of the most important obesity-associated pathologies. It is present in more than one-fifth of obese adults and, as reported in a meta-analysis by Buchwald et al. (2004), approximately 20% of gastric bypass candidates suffer type 2 Diabetes. It usually affects people over the age of 40, but it may also occur earlier, especially in populations with high diabetes prevalence. The prevalence of T2DM is currently estimated in 5-10% of the population with an increasing global trend, especially in children and adolescents (Wild et al., 2004).

Bariatric surgery was first used in 1954 to induce weight loss by the surgeons Kremen et al., based on their observations in short bowel syndrome (SIC) patients and other pathologies in which bowel length or gastric capacity are surgically reduced. The same results were

Offprint requests to: Dr. J. Arturo Prada Oliveira, Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Plaza Fragela s/n, University of Cádiz, Cádiz, Spain. 11003, e-mail: arturo.prada@uca.es

seen in experimental studies using animals since the end of XIX century and XX century (Brenizer, 1929; Booth, 1959), and similar considerations were reported in human studies (West et al., 1939; Meyer, 1946; Buchwald, 1970; Casey and Martin, 1981).

Currently it represents the most important therapeutic alternative to induce weight loss in cases of morbid obesity. Obese patients suffering from T2DM, who undergo bariatric surgery, experience diabetes remission in a significant percentage of cases. Surprisingly, diabetes remission happens before weight loss, suggesting a relationship between digestive tract modification and changes in glucose homeostasis. The incidence of diabetes remission varies according to the surgical technique applied. In the meta-analysis by Buchwald et al. (2009), including a total of 135,246 patients studied for 16 years, found diabetes remission in 56.7% of patients who underwent laparoscopic adjustable gastric banding, 80.3% of patients who underwent gastric bypass, 79.7% of patients who underwent gastropasty and 95.1% of patients who underwent biliopancreatic diversion/duodenal switch.

Restrictive and malabsorptive components are normally present in bariatric surgery procedures and both of them are considered responsible for the anti-diabetogenic effects. The mechanisms responsible for these remain unknown. Theories to explain these anti-diabetes effects may be classified in three different groups for academic purposes: the Ghrelin hypothesis postulates that compromised secretion of the hormone Ghrelin from the stomach might be related to the glucose homeostasis improving effects of some types of bariatric surgeries (Cummings and Shannon, 2003; Holdstock et al., 2003). The lower intestinal hypothesis proposes an accentuated GLP-1 secretion due to expedited delivery of unabsorbed nutrients in the distal gut as anti-diabetes stimulus (Koopmans et al., 1984; Bose et al., 2009; Eickhoff et al., 2014). The upper Intestinal hypothesis suggests that preventing the contact of ingested nutrients with a segment of the proximal small intestine, mainly the duodenum, exert a direct anti diabetic effect via unidentified mechanisms (Rubino and Marescaux, 2004; Duan et al., 2014; Salinari et al., 2014). However, none of these theories alone can totally explain the observed improvement in glucose homeostasis attained with both restrictive and malabsorptive procedures, although an altered secretion of gastrointestinal (GI) hormones may be the basis of these effects.

Surgical modification of the GI tract affects the secretion of different GI hormones and peptides such as Ghrelin and GLP-1. It is well known that these

hormones have the capacity to induce proliferation of beta cells (Drucker, 2003; Kerem et al., 2009; Doss and Smith, 2012). However, very little is known about the effects of bariatric surgery on pancreatic beta cell turnover or even insulin resistance (Salinari et al., 2014).

In our work, we aimed to investigate the potential effects of a purely malabsorptive technique with preserved duodenum in pancreatic beta cell proliferation.

We performed a surgical reduction of 50% of the central portion of the small intestine in a set of non-obese Wistar rats to avoid interference with presurgical insulin resistance (Collantes-Perez et al., 2004) and evaluated its effects on beta cell proliferation/apoptosis balance. An increase of pancreatic islet relative area and beta cell proliferation was observed in intervened animals, revealing a direct effect of digestive tract alteration on pancreatic beta cell homeostasis.

Materials and methods

Animals

All animal procedures were performed with the approval of the Cádiz University School of Medicine (Cádiz, Spain) Committee for the Ethical Use and Care of Experimental Animals. Wistar rats were kept under conventional conditions in an environment-controlled room (20-21°C, 12h light-dark cycle) with water and standard laboratory rat chow available *ad libitum*.

Surgical procedures

Young adult male Wistar rats (n=12) of approximately 250 g, were subjected to a presurgical protocol consisting of a 24 hours fasting period. They were then anaesthetized with isoflurane (Isoflo, Abbott 571329.8) and a surgical resection of 50% of their small intestine was performed by laparotomy. Briefly, after abdominal midline incision, we identified the Treitz's angle and the ileocecal valve as anatomical references. The bowel between these points was exposed and measured. We then made a resection of the central 50%, followed by an end-to-end anastomosis with 5-0 monoplan silk suture, leaving the proximal half of the jejunum and the distal half of the ileum intact (Fig. 1). Short bowel syndrome group consisted of 6 animals. Sham group underwent the laparotomy and bowel section and anastomosis without resection (n=6). Overnight, post-operative rats only received water. For the next five months animals were fed with regular rat chow and their weight was monitored every two weeks.

Tissue preparation and Immunohistochemistry

Animals were sacrificed five months after surgery by an intraperitoneal Chloral Hydrate overdose to avoid unnecessary pain. Pancreas were immediately removed and fixed in Bouin's solution overnight at 4°C, followed by a 72 hours postfix in Formalin at room temperature

(Pearse, 1968). They were then rehydrated using graded alcohols and xylol and embedded in paraffin. Serial 10 µm-microtome sections were obtained, mounted on poly-lysinated slides, and stored until processed.

Sections were deparaffinized in xylol and rehydrated in degraded alcohol series and distilled water. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 3% H₂O₂ solution treatment for 30 min at room temperature.

Short-bowel and beta cell mass

Sections were then washed twice in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4).

To perform histomorphometric studies, insulin was stained using a mouse anti-insulin monoclonal antibody (Sigma, I-2018), a peroxidase conjugated goat anti mouse IgG antibody plus streptavidin complex (Sigma, Mouse Extra-2). Samples were revealed with a solution of 0.3 mg/ml of 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma, D5905) in the presence of 0.2 μ l/ml of H_2O_2 under microscopic control. To determine beta-cell area, the insulin-positive areas were measured using a microscope equipped with a digital camera and the image analysis Cell D software (Olympus, Hamburg, Germany). The investigators who performed the measurements did not know which experimental group the samples belonged to. Beta-Cell area was expressed as the insulin-positive area/total pancreatic area ratio.

Detection of proliferation and apoptosis

Proliferation was assessed by double immunostaining using polyclonal rabbit anti-Ki67

(ABIN1582250) and monoclonal mouse anti-insulin (Sigma, I-2018) antibodies. After deparaffination and rehydration, pancreatic sections were incubated for 30 min with 0.2% Triton x-100 in PBS containing 3% BSA to permeabilize the tissue, and incubated overnight at 4°C with anti-Ki67 and anti-insulin antibodies. Stained sections were revealed using anti-rabbit IgG antibody (Alexa-488 conjugated) and anti-mouse IgG (Alexa-546 conjugated) antibodies (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Beta-Cell apoptosis was determined using the Dead-

End Fluorometric-terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate nick end labelling (TUNEL) System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions, and simultaneously stained using monoclonal mouse anti-insulin (Sigma-Aldrich), revealed with an anti-mouse IgG (Alexa-546 conjugated) antibody (Molecular Probes Inc; Eugene, OR, USA).

To determine the proliferating or apoptotic fraction, insulin+/Ki67+ cells or insulin+/TUNEL+ cells and islets area were quantified in a total of 25 islets per condition. Slides were analyzed using a fluorescence microscope equipped with a digital camera and the image analysis Cell-D software (Olympus, Hamburg, Germany). The results were expressed as number of insulin+ /Ki67+ cells/mm² of islet or insulin+ /TUNEL+ cells/mm² of islet.

Statistical analyses

Results are presented as means \pm SEM of measurements performed in at least five animals per

group. Statistical comparisons were performed either by Mann-Whitney U test or by ANOVA followed by Scheffe's test. All p values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of surgery in weight gain

To evaluate the effect of small bowel resection in animal weight gain, this parameter was quantified every

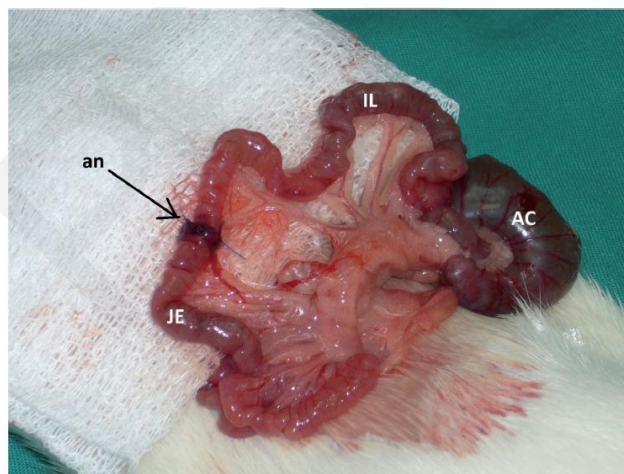


Fig. 1. Remnant small intestine after surgical procedure. The suture (an: anastomosis) is clearly seen at the junction between jejunum (JE) and ileum (IL), marked with an arrow. AC marks the ascending colon.

two weeks, for five months after surgery. As explained in Fig. 2, no statistically differences were observed between sham surgery and intestinal resection in weight gain, although animals that suffered the SIC showed a smaller increase in the normal rate of weight gain compared to controls.

Changes induced by small bowel resection in beta cell population

Insulin positive pancreatic area/total pancreatic area ratio was evaluated five months after surgery in paraffin embedded pancreatic tissue sections immunostained using a mouse anti-insulin antibody (Fig. 3). A significant enhancement in insulin positive pancreatic

area/total pancreatic area ratio was observed in the experimental group with intestinal resection compared with Sham rats (Fig. 4A).

In addition, we analyzed total number of islets/total pancreatic area (mm^2) and an increment in this ratio in the group of rats that underwent intestinal resection was also observed five months after surgery (Fig. 4B). With these figures we described that the islets appeared larger in the SIC against the sham group, and the number of islets was increased, although this fact was not statistically significant.

Effect of small bowel resection in beta cell turnover

To evaluate the role of beta cell proliferation in relative islet area increment observed after surgery, the percentage of proliferating insulin-positive cells was quantified. We used paraffin embedded pancreatic tissue sections taken from rats with intestinal resection and sham surgery (Fig. 5). These proliferative beta cells were stained with anti-insulin/ki67 antibodies. An increase in ki67 positive/insulin positive cell numbers was observed

in rats with intestinal resection in relation to control animals five months after the intestinal resection (Fig. 6).

Changes in beta cell apoptosis ratio could also contribute to these modifications in islet relative area. For this reason, TUNEL technique and insulin staining were simultaneously used to evaluate the beta cell apoptosis ratio (Fig. 7). No significant differences were found in beta cell apoptosis rate between experimental groups five months after intestinal resection (Fig. 8).

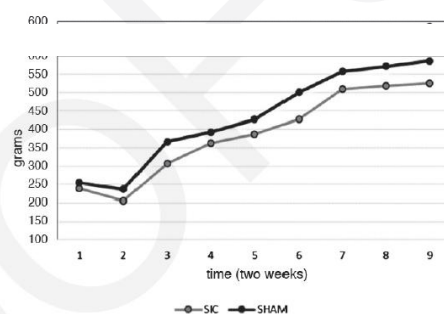


Fig. 2. Animal weight was quantified every two weeks and weight gain (in grams) (Y axis) is represented in both experimental groups along time (X axis) as mean \pm SEM. The figure showed a pattern of weight gain starting 4 weeks after surgery. Point 1 of the X-axis represents the weights of the rats at surgery time. In the first two weeks after surgery there was no increase in weight. Both experimental groups showed a decrease in weight in these weeks, due to surgical stress (point 2 of the X axis). No-significant difference was observed between both groups. The figure shows a delay between the last point and sacrifice, due to the experimental procedure.

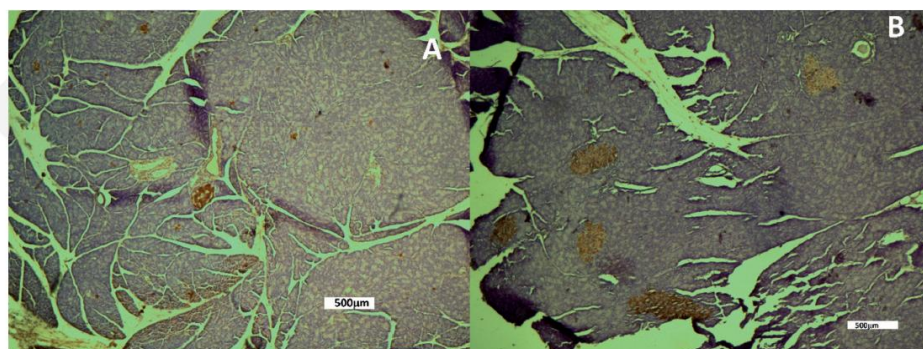


Fig. 3. Insulin-positive immunostained islets, counterstained with haematoxylin. A. Control sample. B. SIC sample. Larger islets were observed in the short bowel syndrome.

Changes induced by surgery in pancreatic islet size distribution

The effect of surgery on the size of pancreatic islets distribution was evaluated in paraffin embedded tissue sections of pancreas immunostained with mouse anti-insulin antibody. We observed a significant enhancement in the number of large pancreatic islets (with areas $>5000 \mu\text{m}^2$) in resected rats compared with Sham rats. No different values were observed in other ranks of islet size between both groups (Fig. 9).

These data reaffirmed that observed in the other figures and results, in the sense that the main mechanism related to beta mass expansion in SIC must be proliferation rather than neogenesis. Proliferation of pre-existing beta cells increased the area of islets, but not the number of islets (Fig. 4), and for this reason the

immunohistological analysis showed an increase of large islets in the SIC (Fig. 9). Instead, the number of small islets in the pancreas would be related through a mechanism of transdifferentiation of the epithelial ducts or stem cells.

Discussion

The positive direct effects of bariatric surgery techniques on the clinical T2DM course are well known and there are a set of hypothesis to explain them. One of the most important hypothesis presents duodenal exclusion as a major inductor of changes that result in glucose homeostasis improvement. These effects take place short a time after surgical intervention (Lautz et al., 2011; Schauer et al., 2014). In this study we used an experimental surgery in which the entire duodenum is

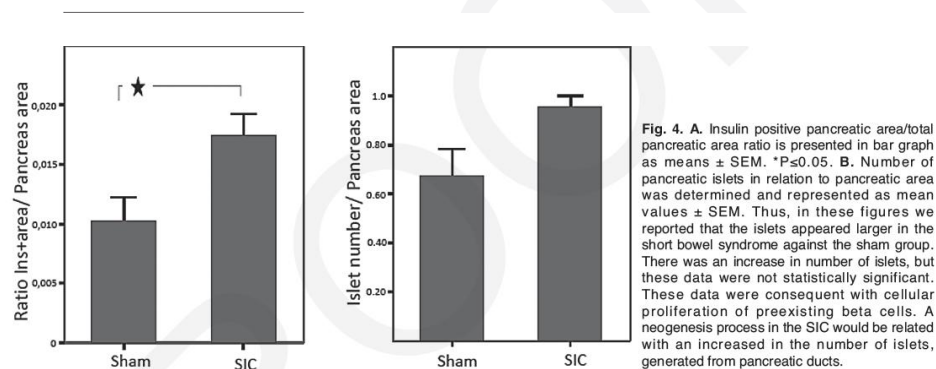


Fig. 4. A. Insulin positive pancreatic area/total pancreatic area ratio is presented in bar graph as means \pm SEM. $*P \leq 0.05$. B. Number of pancreatic islets in relation to pancreatic area was determined and represented as mean values \pm SEM. Thus, in these figures we reported that the islets appeared larger in the short bowel syndrome against the sham group. There was an increase in number of islets, but these data were not statistically significant. These data were consequent with cellular proliferation of preexisting beta cells. A neogenesis process in the SIC would be related with an increased in the number of islets, generated from pancreatic ducts.

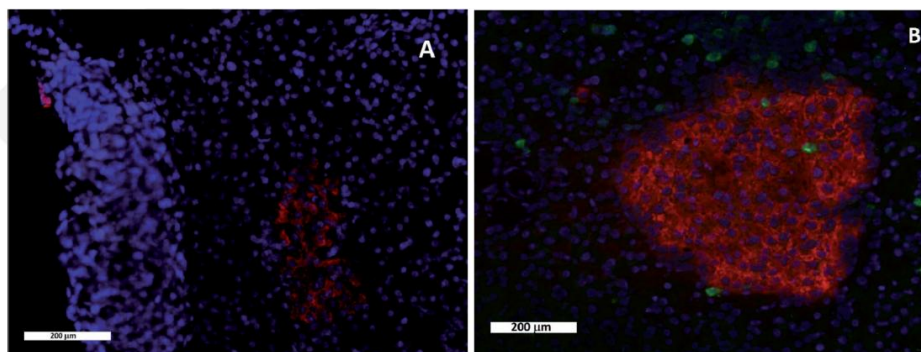


Fig. 5. Proliferating insulin positive cells stained with anti-Ki67 antibody. A. Control sample. B. SIC sample. The number of insulin positive cells, which express the protein Ki67 (green-fluorescent Alexa Fluor 488) related to proliferation process was increased in the SIC rats.

preserved as well as the proximal half of the jejunum and distal half of the ileum, representing a resection of approximately 50% of the total length of the intestine (Collantes-Pérez et al., 2004). We performed this surgery on normal weight Wistar rats, because if we used an animal model of obesity, insulin resistance or even diabetes, the effects on glucose homeostasis and pancreatic beta cell apoptosis/proliferation balance could have been influenced by the presurgical condition. By using normal healthy weight animals, the changes observed can only be interpreted as a direct effect of the surgery itself.

Various diseases require a surgical resection of a variable length of the small intestine in humans, and their nutritional consequences have been well studied. Necrotizing enterocolitis and intestinal atresia in

children, as well as vascular thrombosis, malignancies and Crohn's disease in adults are the most frequent indications of intestinal resection. Our surgical experience in these cases has demonstrated that resections of up to 50% may be well tolerated without the need for nutritional support. Our data on animal weight monitoring during the study is in agreement with this observation in humans, since no surgery-induced changes in weight gain were found (Fig. 2).

We examined the histomorphometric features of pancreatic islets five months after surgery, comparing sham and 50% small intestine resected animals. The experimental group with the bowel resection showed a significant increment of relative area of pancreatic islets and islet number (Fig. 4A,B). Both figures showed that the islets appeared larger in the SIC against the Sham group, but there was no increase in the number of islets in either group. These data were related to the pancreas total area. These findings could be the consequence of a cellular mechanism of proliferation, where beta cells

contribute homogeneously to the islets area. The proliferation increases the beta cell mass from the preexisting beta cells (Yesil and Lammert, 2008). Meanwhile, the neogenesis process, which would be related to an increase in the number of small islets generated from stem cells or epithelial cells located in the pancreatic ducts, is not coincident with our observations.

To clarify the mechanism underlying the observed islet area increment, pancreatic beta cell proliferation and apoptosis were quantified. No surgery induced changes were observed in beta cell apoptosis rate (Fig.

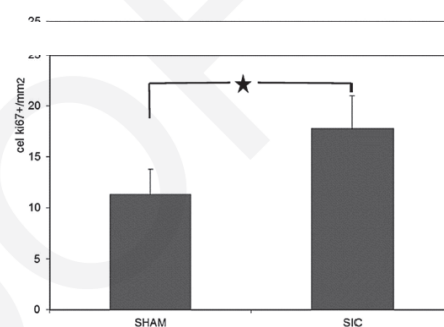


Fig 6. Proliferating beta cells were quantified in pancreas sections from rats with intestinal resection and sham five months after surgery. Beta cell proliferation rate is shown in bar graph as means \pm SEM, where the Y axis represents the number of Ki 67 positive/insulin positive cells per islet area expressed in mm². * $P < 0.05$. Thus, these data show that in the bowel resection the number of proliferating beta cells increased compared to surgical controls. This data was statistically significant.

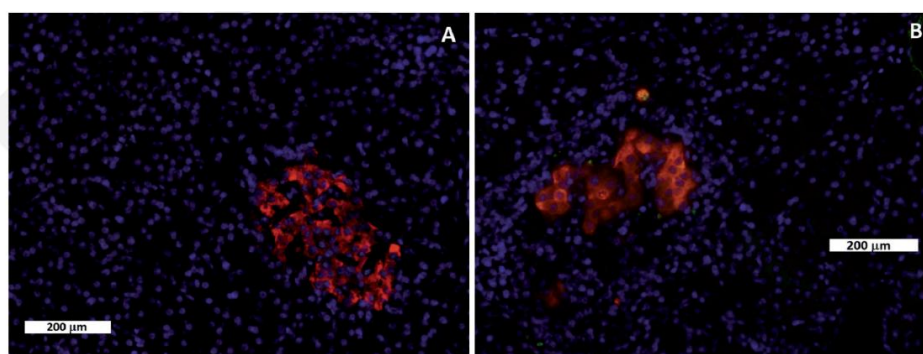


Fig. 7. TUNEL technique. A. Control sample. B. Some isolated positive cells (green-fluorescent Alexa 488) in a SIC sample. Insulin positive cells stained in islet with red-fluorescent (Alexa Fluor 546).

Short-bowel and beta cell mass

8). On the other hand, beta-cell proliferation rate was significantly higher in the experimental animals that underwent the surgical resection (Fig. 6). The sum of these events could explain the increment of islet area and number. An increase of total pancreatic islet area in response to different stimulus is due to both neogenesis and beta cell replication processes (Yesil and Lammert, 2008; Bonner-Weir et al., 2010). An indirect measurement of the participation of neogenesis and beta cell replication in islet area increment is the study of islet size distribution. An increment in beta cell clusters and/or small islets indicates a major participation of neogenesis in islet area increment, while an increment of large size islets suggests an increase in beta cell replication as the main mechanism responsible for the observed islet area increment. In our study, a 50% of small intestine resection preserving duodenum, proximal jejunum and distal ileum, induced a long term increment of large size islet number (Fig. 9). As stated before, this observation suggests that beta cell replication is the main

responsiveness (Araujo et al., 2012). This is in accordance with data from GK rats subjected to duodenal-jejunal exclusion, in which pancreatic islet insulin mRNA expression was higher than in controls (Donglei et al., 2012). Another feature supporting the duodenal-jejunal bypass induced improvement in glucose homeostasis in GK has been recently reported by Speck et al. (2011). They have reported an increment of beta cell area and a reduction of islet fibrosis induced by surgery. Similar results have been obtained in rodents and humans after Roux-en-Y gastric bypass (Li et al., 2010; Rabiee et al., 2011; Yu et al., 2013). A common feature among these reports was duodenal exclusion, coherent with the upper intestinal hypothesis. The main problem with duodenal exclusion to the transit of nutrients is the adverse effect on the absorption of

mechanism implicated in surgery induced islet area increment.

Some patients suffer severe hypoglycemic episodes after bariatric surgery for morbid obesity. To control these episodes, patients often require partial pancreatectomy. Pathological studies of the resected pancreatic portions show typical images of nesidioblastosis (Service et al., 2005). Although no nesidioblastosis images were observed in our study group, we found an increased islet area and number, which could suggest a different stage of a common process. Recently, the effects of intestine alteration in rodent beta cell functionality have been studied using different surgical models. Isolated islets from duodenal-jejunal bypass performed on Western diet obese Wistar rats have shown an enhancement in beta cell glucose

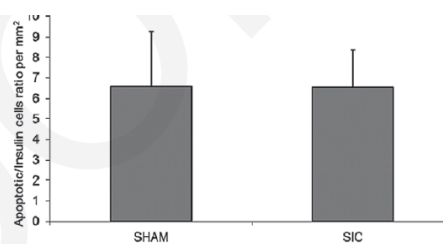


Fig. 8. Apoptotic beta cells were quantified in pancreatic sections from rats with intestinal resection and sham five months after surgery. Apoptotic beta cell ratio is presented in bar graph as means \pm SEM of TUNEL positive/insulin positive cells per islet area expressed in mm². There were not differences between groups.

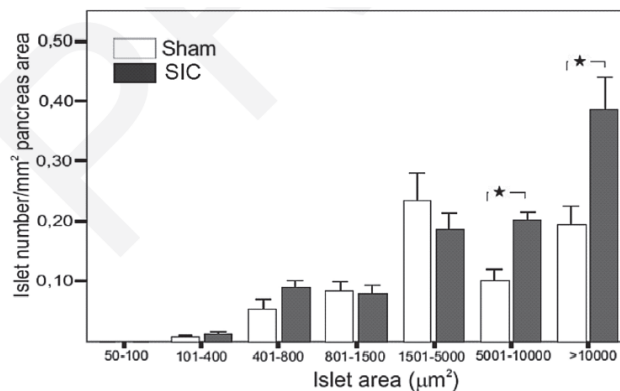


Fig. 9. Size distribution of islets was calculated in pancreatic sections from rats with intestinal resection and sham five months after surgery, by quantifying islet number belonging to each area value interval and is represented in bar graph as means \pm SEM of islet number. * $P < 0.05$. These data showed that the islets not only were increased in number in SIC, but they were larger than in surgical control. When we grouped the islets by the size of the area, the graph showed that in the Sham group the islets used to be between a wide ranges of 2000-10000 µm². Meanwhile, in SIC an abundant number of islets presented a large area superior to 0.01 mm².

different micronutrients which may have negative long term consequences. Instead of this, in our surgical model the duodenal segment is preserved. Furthermore the nutritional status is maintained without other undesirable effects such as chronic diarrhea, dumping syndrome, etc. In conclusion, using an animal model in which overweight is not a participating variable, our work demonstrates the effect of a non-weight-loss-inducing intestinal surgery in beta cell increase rate. This effect is mediated by duodenal exclusion. Our data suggest that other different mechanisms than those involved in the proximal gut hypothesis should be implicated in the events of turnover and expansion of adult beta cell mass. Moreover, the data suggest that the use of this surgical technique with low effects on nutrition can be a good approach to physiopathological mechanism in T2DM, mainly in patients in whom obesity is not an associated problem.

Acknowledgements. This work was supported by the Andalusian Health Servicegrants, project PI-0170-2010, related to the CTS-368 Group. We would like to thank Mss Ana Rosa Wakim Pinto Souza and Mss Chiara

Firetto Saladino, pregraduate medical students, for theirs generous help and assistance. Grant support: This work was partially supported by the Andalusian Health Service, project PI-0170-2010, related to the CTS-368 Group.

References

- Araujo A.C., Bonfleur M.L., Balbo S.L., Ribeiro R.A. and de Freitas A.C. (2012). Duodenal-jejunal bypass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in Western diet obese rats. *Obes. Surg.* 22, 819-826.
- Bonner-Weir S., Li W.C., Ouziel-Yahalom L., Gordon L.G., Weir C. and Sharma A. (2010). Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 59, 2340-2348.
- Booth C.C. (1959) Intestinal hypertrophy following partial resection of the small bowel in the rat. *Br. J. Surg.* 46, 403-409.
- Bose M., Oliván B., Teixeira J., Pi-Sunyer J.X. and Laferrère B. (2009). Do incretins play a role in the remission of Type 2 Diabetes after gastric bypass surgery: what are the evidence? *Obes. Surg.* 19, 217-229.
- Brenizer A.G. (1929). Extensive resections of the small intestine. *Ann. Surg.* 89, 675-679.
- Buchwald H. (1970). A by-pass-operation for obese hyperlipidemic patients. *Surgery* 70, 62-65.
- Buchwald H., Avidor Y., Braunwald E., Jensen M.D., Pories W., Fahrback K., and Schoelles K. (2004). Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 292, 1724-1737.
- Buchwald H., Estok R., Fahrback K., Banel D., Jensen MD., Pories W.J., Bantle J.P. and Sledge I. (2009). Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* 122, 248-256.
- Casey L.C. and Martin E.W. (1981). Treatment of morbid obesity by gastric partitioning. *World. J. Surg.* 5, 829-831.
- Collantes-Pérez J., Prada-Oliveira J.A., Gómez-Luy C., Vallo De Castro J.J., and Verástegui C. (2004). A useful experimental model of short bowel syndrome. *J. Invest. Surg.* 17, 1-6.
- Cummings D.E. and Shannon M.H. (2003). Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2999-3002.
- Donglei Z., Liesheng L., Xun J., Chenzhu Z. and Weixing D. (2012). Effects and mechanism of duodenal-jejunal bypass and sleeve gastrectomy on GLUT2 and glucokinase in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Med. Res.* 17, 15.
- Doss A.L. and Smith P.G. (2012). Nerve-Langerhans cell interactions in diabetes and aging. *Histol. Histopathol.* 27, 1589-1598.
- Drucker D.J. (2003). Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 144, 5145-5148.
- Duan J., Zhou J., Reng F., Tan C., Wang S. and Yuan L. (2014). Mid to distal small bowel resection with the preservation of the terminal ileum improves glucose homeostasis in diabetic rats by activating the hindgut-dependent mechanism. *J. Gastrointest. Surg.* 18, 1186-1193.
- Eickhoff H., Louro T.M., Matafome P.N., Vasconcelos F., Seica R.M., Castro E. and Sousa F. (2014). Amelioration of glycemic control by sleeve gastrectomy and gastric bypass in a lean animal model of type 2 diabetes: restoration of gut hormone profile. *Obes. Surg.* (in press).
- Holdstock C., Engstrom B. E., Ohrvall M., Lind L., Sundborn M. and Karlsson F. A. (2003). Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3177-3183.
- Kerem M., Salman B., Ozsoy S., Pasaoglu H., Bedirli A., Hazirolu R. and Yilmaz T.U. (2009). Exogenous ghrelin enhances endocrine and exocrine regeneration in pancreatectomized rats. *J. Gastrointest. Surg.* 13, 775-783.
- Koopmans H.S., Ferri G.L., Sarson D.L., Polak J.M. and Bloom S.R. (1984). The effects of ileal transposition and jejunoileal bypass on food intake and GI hormone levels in rats. *Physiol. Behav.* 33, 601-609.
- Kremen A.J., Linner J.H. and Nelson C.H. (1954). An experimental evaluation of nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Ann. Surg.* 140, 439-447.
- Lautz D., Halperin F., Goebel-Fabbri A. and Goldfine A.B. (2011). The great debate: medicine or surgery. What is best for the patient with type 2 diabetes? *Diabetes Care* 34, 763-770.
- Li Z., Zhang H.Y. and Lu L.X. (2010). Roux-en-Y gastric bypass promotes expression of PDX-1 and regeneration of beta-cells in Goto-Kakizaki rats. *World J. Gastroenterol.* 16, 2244-2251.
- Meyer H.W. (1946). Acute superior mesenteric artery thrombosis: Recovery following extensive resection of the large and small intestine. *Arch. Surg.* 53, 298-302.
- Pearse A.G. (1968). Histochemistry. Theoretical and applied. 3rd Edition. Vol 1. Chapter 5. The chemistry of fixation. 70-106.
- Rabiee A., Magruder J.T., Salas-Carrillo R., Carlson O., Egan J.M., Askin F.B., Elahi D. and Andersen D.K. (2011). Hyperinsulinemic hypoglycemia after Roux-en-Y gastric bypass: Unraveling the role of gut hormonal and pancreatic endocrine dysfunction. *J. Surg. Res.* 167, 199-205.
- Rubino F. and Marescaux J. (2004). Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann. Surg.* 239, 1-11.
- Salinari S., Le Roux C. W., Bertuzzi A., Rubino F. and Mingrone G. (2014). Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats without changes in incretins

Short-bowel and beta cell mass

- or insulin secretion. *Diabetes* 63, 1069-1078.
- Schauer P.R., Bhatt D.L., Kirwan J.P., Wolski K., Brethauer S.A., Navaneethan S.D., Aminian A., Pothier C.E., Kim E., Nissen S.E. and Kashyap S.R. (2014). Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes -3 year outcomes. *N. Engl. J. Med.* 370, 2002-2013.
- Service G.J., Thompson G.B., Service F.J., Andrews J.C., Collazo-Clavell M.C. and Lloyd R.V. (2005). Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after Gastric-bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 353, 249-254.
- Speck M., Cho Y.M., Asadi A., Rubino F. and Kieffer T.J. (2011). Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from beta-cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases enteroendocrine cells coexpressing GIP and GLP-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E923-E932.
- Yesil P. and Lammert E. (2008). Islet dynamics: A glimpse at beta cell proliferation. *Histol. Histopathol.* 23, 883-895.
- Yu H., Zheng X. and Zhang Z. (2013). Mechanism of Roux-en-Y gastric bypass treatment for type 2 diabetes in rats. *J. Gastrointest. Surg.* 17, 1073-1083.
- West E.S., Montague J.R. and Frederick R.J. (1939). Digestion and absorption in man with three feet small intestine. *Am. J. Dig. Dis.* 5, 690-694.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. and King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.

Accepted November 14, 2014